

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. Januar 2003 (16.01.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/004014 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 31/28,
31/30, 31/315, 31/295, C07F 1/08, 3/06, 15/04, 15/06,
15/02, 13/00, 11/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/07299

(22) Internationales Anmeldedatum:
2. Juli 2002 (02.07.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
IDP 2001 0552 3. Juli 2001 (03.07.2001) UZ
102 01 693.3 17. Januar 2002 (17.01.2002) DE

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): HAEMATO-BASICS GMBH [DE/DE]; Biotechnologipark, TGZ II, 14943 Luckenwalde (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TATARSKY, Valeriy [UZ/UZ]; Chilanzar-17, Building 33, Apartment 105, Tashkent 700135 (UZ).

(74) Anwälte: HUBER, Bernhard usw.; Weickmann & Weickmann, Postfach 860 820, 81635 München (DE).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht
— mit geänderten Ansprüchen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: ORGANOMETALLIC ANTI-TUMOUR AGENT

(54) Bezeichnung: METALLORGANISCHES ANTITUMORMITTEL

(57) Abstract: The invention relates to complexes of general formula D₂-M-T, wherein D represents a β-diketone, M represents a metal atom and T represents a substance comprising at least one group containing N, O or S. The invention also relates to the use of said complexes as anti-tumour agents.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Komplexe der allgemeinen Formel D₂-M-T, wobei D ein β-Diketon, M ein Metallatom und T eine Substanz mit mindestens einer N-, O- oder S-enthaltenden Gruppe darstellt, sowie deren Verwendung als Antitumormittel.



WO 03/004014 A1

Metallorganisches Antitumormittel

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft Komplexe der allgemeinen Formel



10 wobei

D ein β -Diketon, M ein Metallatom und T eine Substanz mit mindestens einer N-, O- oder S-enthaltenden Gruppe darstellt, sowie deren Verwendung als Antitumormittel.

15 In Deutschland erkranken jährlich 300.000 Menschen an Krebs und etwa jeder fünfte Deutsche stirbt an einer Tumorerkrankung, eine Zahl, die zweifelsohne in den nächsten Jahren zunehmen wird. Etwa 55 % aller Krebspatienten werden mit einer noch örtlich begrenzten Tumorerkrankung diagnostiziert, während bei den restlichen 45 % eine bereits
20 fortgeschrittene, metastasierende Tumorerkrankung vorliegt. Viele Krebserkrankungen können jedoch durch rechtzeitige Diagnostik und Therapie geheilt werden. Grundsätzlich gibt es verschiedene Therapieformen, um Krebs zu behandeln. Hauptziel einer jeden Krebstherapie ist dabei jedoch immer die maximale Zerstörung und
25 Entfernung aller Tumorzellen bei möglichst geringer Schädigung des den Tumor umgebenden normalen Gewebes.

Örtlich begrenzte Tumorerkrankungen werden vorwiegend durch lokale Therapiemaßnahmen, wie Chirurgie und Strahlentherapie, behandelt. Bei
30 der Chirurgie wird der Primärtumor durch eine Operation möglichst vollständig entfernt, während die Tumorzellen im Primärtumor mit Hilfe der Strahlentherapie durch gezielte Bestrahlung abgetötet werden. Angriffsort

- 2 -

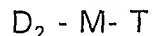
der Bestrahlung ist die im Zellkern jeder Zelle befindliche DNA. Die Bestrahlung führt zu einer Vielzahl von DNA-Schäden, die nicht mehr vollständig von zelleigenen Enzymen repariert werden können. Als Folge davon leitet die Zelle den programmiert durchgeführten Zelltod ein. In
5 weiteren Schritten werden die geschädigten Zellen aufgelöst und die dabei entstehenden Fragmente werden vom Immunsystem des Körpers abgebaut.

Örtlich begrenzte Tumorerkrankungen können sich jedoch über die Lymph- und Blutbahnen ausbreiten. Haben sich schon Metastasen in anderen
10 Organen des Körpers angesiedelt, so reichen die lokalen Therapiemaßnahmen alleine nicht mehr aus, um die weitere Ausbreitung der Tumorerkrankung zu stoppen. In diesen Fällen muss die Behandlung den gesamten Körper umfassen, was durch eine Chemotherapie erreicht werden kann. Bei der Chemotherapie werden gezielt Substanzen, nämlich
15 Zytostatika, verabreicht, welche das Wachstum von Tumorzellen hemmen und somit die Tumorzellen abtöten. Zu den bekannten Zytostatika zählen Antimetabolite, Topoisomerase-Hemmer, alkylierende Wirkstoffe und pflanzliche Alkaloide. Obwohl alle Zytostatika eine Hemmung des Tumorzellwachstums bewirken, sind die den verschiedenen Zytostatika
20 zugrundeliegenden Wirkprinzipien völlig verschieden. Ein möglichst großes Spektrum von Zytostatika mit unterschiedlichen Wirkprinzipien ist für die Behandlung der verschiedenen Tumorerkrankungen von entscheidender Bedeutung, da jede Tumorerkrankung anders ist und eine spezifische Art der Behandlung benötigt. Trotz der großen Anzahl der bislang bekannten
25 Zytostatika können bislang noch nicht alle Tumorerkrankungen therapiert werden. Daher besteht immer noch ein fortwährendes Interesse an der Entwicklung neuartiger Zytostatika.

Der vorliegenden Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, neuartige
30 Komplexe zu schaffen, welche Zytostatika mit hoher Antitumorstärke und breitem Wirkungsspektrum gegenüber einer Vielzahl von Tumorerkrankungen darstellen.

- 3 -

Diese Aufgabe wurde erfindungsgemäß durch Bereitstellung eines Komplexes der allgemeinen Formel



5

gelöst, wobei

D ein β -Diketon darstellt,

M ein Metallatom, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Cr, Cu, Mn, Fe, Ni, Co, Zn und Mo darstellt,

10 T eine Substanz mit mindestens einer N-, O- oder S-enthaltenden Gruppe darstellt und

wobei M mit T in einer Elektronen-Donor-Akzeptor-Wechselwirkung steht und M im Komplex eine freie Koordinationsstelle aufweist.

15 Der erfindungsgemäße Komplex bildet eine neue Klasse von monokristallinen, metallorganischen Komplexverbindungen mit tetragonal-bipyramidaler Geometrie. Das Metallatom M des erfindungsgemäßen Komplexes befindet sich im Zentrum der tetragonalen Bipyramide. Die beiden zweizähligen β -Diketonliganden D nehmen jeweils mit ihren beiden

20 Komplex-bildenden Sauerstoffatomen die vier äquatorialen Positionen der tetragonalen Bipyramide ein. Eine der beiden axialen Positionen der tetragonalen Bipyramide ist durch die Substanz T besetzt, wobei das N- bzw. O- bzw. S-Atom der N- bzw. O- bzw. S-enthaltenden Gruppe der Substanz T als Komplex-bildendes Atom dient und in einer Elektronen-

25 Donor-Akzeptor-Wechselwirkung mit dem Metallatom M steht. An der anderen axialen Position der tetragonalen Bipyramide befindet sich eine freie Koordinationsstelle. Die freie Koordinationsstelle am Metallatom M des erfindungsgemäßen Komplexes ermöglicht eine spezifische Wechselwirkung mit anderen Molekülen, wie z.B. mit Sauerstoff,

30 Stickoxiden oder einer molekularen Bindungsstelle auf der Oberfläche von Target-Zellen etc.

- 4 -

Strukturelle Untersuchungen konnten zeigen, dass das Metallatom M des erfindungsgemäßen Komplexes etwa 2 Å von seiner idealen Position in der tetragonalen Bipyramide in Richtung der Substanz T abweicht. Dadurch nimmt die Elektronen-Donor-Akzeptor-Wechselwirkung zwischen dem Metallatom M und der Substanz T den Charakter einer Doppelbindung an. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass zwei der vier äquatorialen Positionen etwas in Richtung des Metallatoms verlagert sind, während die anderen beiden äquatorialen Positionen etwas von dem Metallatom entfernt angeordnet sind.

Das β -Diketon D des erfindungsgemäßen Komplexes ist dadurch ausgezeichnet, dass seine dreidimensionale Struktur (i) eine optimale Chelatbildung mit dem Metallatom M an dessen äquatorialen Koordinationsstellen ermöglicht und (ii) die Elektronen-Donor-Akzeptor-Wechselwirkung zwischen der Substanz T und dem Metallatom M nicht stört. Vorzugsweise ist das β -Diketon jedoch ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Acetylaceton und dessen höheren Alkylanalogen, Dibenzoylmethan und Diethyldithiocarbamin.

Das Metallatom M des erfindungsgemäßen Komplexes ist ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Cr, Cu, Mn, Fe, Ni, Co, Zn und Mo. Überdies ist das Metallatom M dadurch gekennzeichnet, dass es eine tetragonal-bipyramidale Anordnung der Liganden D und T ermöglicht, wobei eine axiale Koordinationsstelle des Metallatoms frei bleibt. Besonders bevorzugte Metallatome M sind Cu und Mn.

Die Substanz T des erfindungsgemäßen Komplexes weist mindestens eine N-, O- oder S-enthaltende Gruppe auf, die über das N- bzw. O- bzw. S-Atom eine Elektronen-Donor-Akzeptor-Wechselwirkung mit dem Metallatom M an einer der axialen Koordinationsstellen von M eingeht. Dabei wirkt das N- bzw. O- bzw. S-Atom der Substanz T als Elektronendonator und stellt dem Metallatom M als Elektronenakzeptor ein freies Elektronenpaar zur

- 5 -

Verfügung. Vorzugsweise weist die Substanz T mindestens eine NH_2 -, NH -, N -, O - oder S -enthaltende Gruppe auf. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist die Substanz T bereits eine Antitumorwirksamkeit auf und ist ausgewählt aus der Gruppe, bestehend

5 aus 2,4-Dihydroxy-5-fluorpyrimidin, 5-Fluor-1-(tetrahydro-2-furyl)-uracil, 2-[Bis-(2-chlorethyl)-amino]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazephosphorin-2-oxid, 1,2-Imidopropylsäureamid (Leacadin), 2-Hydroxymethyl-5-hydroxy- γ -pyrone, 2,4,6-Trimethylpyridin, 2,4,6-Tri-2-pyridyl-1,3,5-triazin, 4-[Bis-(2-chlorethyl)-amino]-L-phenylalanin (Melfalan), 2-(3-Pyridyl)-piperidin, 2-2'-

10 Bipyridin, 2-Methyl-(5-trimethyl-butyl-1-il-ol-3)-pyridin, 2-Methyl-(3-dimethyl-amino-1-propinyl)-pyridin und 2-Methyl-5-ethylen-pyridin.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst der erfindungsgemäße Komplex Kupfer als zentrales Metallatom M,

15 Acetylaceton oder ein höheres Alkylanalogen desselben als β -Diketon D und eine Substanz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 2,4-Dihydroxy-5-fluorpyrimidin, 5-Fluor-1-(tetrahydro-2-furyl)-uracil, 2-[Bis-(2-chlorethyl)-amino]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazephosphorin-2-oxid, 1,2-Imidopropylsäureamid, 2-Hydroxymethyl-5-hydroxy- γ -pyrone, 2,4,6-

20 Trimethylpyridin, 2,4,6-Tri-2-pyridyl-1,3,5-triazin, 4-[Bis-(2-chlorethyl)-amino]-L-phenylalanin, 2-(3-Pyridyl)-piperidin, 2-2'-Bipyridin, 2-Methyl-(5-trimethyl-butyl-1-il-ol-3)-pyridin, 2-Methyl-(3-dimethyl-amino-1-propinyl)-pyridin und 2-Methyl-5-ethylen-pyridin als Substanz T.

25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst der erfindungsgemäße Komplex Mn als zentrales Metallatom M, Acetylaceton oder dessen höhere Alkylanaloga als β -Diketon D und eine Substanz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 2,4,6-Trimethylpyridin, 2,4,6-Tri-2-pyridyl-1,3,5-triazin, 2-2'-Bipyridin, 2-(3-Pyridyl)-piperidin, 1,2-

30 Imidopropylsäureamid und 4-[Bis-(2-chlorethyl)-amino]-L-phenylalanin als Substanz T.

- 6 -

Es hat sich nun überraschenderweise gezeigt, dass der erfindungsgemäße Komplex eine neue Klasse von Zytostatika mit ausgezeichneter Antitumorwirksamkeit bildet. Stellt die Substanz T in einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Komplexes bereits ein Antitumormittel dar, wurde festgestellt, dass der erfindungsgemäße Komplex eine im Vergleich zu der darin enthaltenen Substanz T stark erhöhte Antitumorwirksamkeit zeigt. Zudem weist der erfindungsgemäße Komplex immunmodulatorische und antiproliferative Eigenschaften sowie eine anti-angiogene Wirksamkeit auf und besitzt eine gegenüber herkömmlichen Antitumormitteln stark erhöhte Hydrolysestabilität, wodurch er in weiten Bereichen der Tumorbekämpfung einsetzbar ist. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass der erfindungsgemäße Komplex keine Arzneimittelresistenz hervorruft und unter bestimmten Bedingungen in der Lage ist, Apoptose und Angiogenese bei Krebszellen herbeizuführen.

Besonders bevorzugt wird im Rahmen der Erfindung der Komplex aus Kupfer oder Mangan, Acetylaceton und 4-[Bis-(2-chlorethyl)-amino]-L-Phenylalanin (Melphalan), im Folgenden als MOC-Melphalan bezeichnet. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass sich diese Substanz überwiegend im Tumorgewebe anreichert, katalytisch Fragmente von Proteinrezeptoren auf der Membranoberfläche oxidiert und damit Metastasierungsprozessen vorbeugt. Die Substanz verfügt weiter über immunmodulierende Wirkungen über die Regulation des Verhältnisses $T_{\text{help}}/T_{\text{supr}}$ und beeinflusst die Bildung von spezifischen Antikörpern. Die Substanz ist chemisch stabil und hat eine lang anhaltende Wirkung. Von besonderer Bedeutung ist, dass die Substanz die Blut-Hirn-Schranke überwindet und damit die Behandlung von Gehirntumoren ermöglicht. Außerdem wird keine Arzneimittelresistenz erzeugt. Untersuchungen am Adenokarzinom, Sarkom, Leukämiezellen, Melanom und Nierenzellkarzinom (RENCA) ergaben eine im Vergleich zu Melphalan weit überlegene Wirksamkeit.

- 7 -

Hinsichtlich des Wirkungsmechanismus dieser besonders bevorzugten Substanz wird angenommen, dass sie den Stickstoffmonoxidgehalt und die Ca-Ionenkonzentrationen in den Tumorzellen zu regulieren vermag. Durch "Absaugung" der Ca^{2+} -Ionen aus den Tumorzellen wird der Glykolyseprozess inhibiert und damit die Funktion ihrer Mitochondrien beeinträchtigt. Bei der Rekombination der aktiven Formen des Sauerstoffs entstehen durch MOC-Melphalan Bedingungen, die zur Zerstörung der Tumorzellen unter Mithilfe der Makrophagen - die mit NO beladen sind - führen. Außerdem wirkt die Substanz auf die Genexpression durch Eindringen in den Kern der Tumorzellen, zerstört dadurch den Zellkern und inhibiert die Proliferationsaktivität. Schließlich wurde festgestellt, dass sie auch eine zweischichtige Kapselbildung des Tumors hervorruft, wobei die innere Schicht aus fettähnlichen Zellen besteht. Hierdurch wird die Nährstoffversorgung des Tumors zusätzlich unterdrückt und gegebenenfalls ein gezielter chirurgischer Eingriff ermöglicht.

Eine weitere besonders bevorzugte Substanz aus den erfindungsgemäßen Komplexen ist der Komplex von Kupfer-Acetylacetonat mit Tegafur: $\text{Cu}(\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2)_2 \cdot \text{C}_8\text{H}_9\text{O}_3\text{N}_2\text{F}$ - MOC-Tegafur.

20

Die entscheidenden Nachteile von Tegafur [5-Fluoro-1-(tetrahydro-2-furyl)-uracil] sind die kurze Wirkdauer, die nur zu einer Unterdrückung der Synthese von Nukleinsäuren führt, und die schlechte Löslichkeit in Wasser. Trotz seiner niedrigen Toxizität (LD_{50} beträgt 650 mg/kg) zeigt das Präparat eine starke Wirkung auf die Blutbildung und ruft Leukopenie, Thrombozytopenie und Anemie hervor. Es reichert sich in hohen Konzentrationen im Gehirngewebe an und ruft Diarrhoe und Stomatitis hervor. Das Präparat Tegafur darf nicht bei Nieren- und Leber-Krankheiten (im terminalen Zustand), bei Blutungen und bei einem Gehalt an Leukozyten- und Thrombozyten unter $3 \cdot 10^9/\text{l}$ angewendet werden. Die Anwendung des Tegafurs ist begrenzt bei der Behandlung von Dün- und

30

Dickdarmtumoren, rezidiven Magentumoren, sowie bei Mamma- und Eierstockkarzinom.

Die erfindungsgemäße Kombination des Moleküls Tegafur mit dem Kupfer-Acetylacetonat-Molekül führt zu einer neuen chemischen Verbindung, die
5 diese zahlreichen Nachteile nicht aufweist. Der metallorganische Komplex MOC-Tegafur verfügt über ein breites Spektrum an antitumorwirkenden, antimetastasierenden und immunregulierenden Eigenschaften. Es ist eine wasserlösliche Substanz mit prolongierender Wirkung, und es ruft keine
10 Arzneiresistenz im Organismus hervor. Ein weiterer entscheidender Vorteil ist die therapeutische Dosierung des Präparates MOC-Tegafur (Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht). Bei Tegafur allein beträgt diese nur 2,1 mg. Auch MOC-Leacadin ($\text{Cu/Mn}(\text{acac})_2$ -Leacadin) zeigt die bei MOC-Melphalan näher beschriebenen Wirkungen wie "Absaugung" der Ca^{2+} -Ionen,
15 Zerstörung der Mitochondrien in Tumorzellen usw.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft demzufolge eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend wenigstens einen erfindungsgemäßen Komplex. Die pharmazeutische Zusammensetzung
20 kann einen einzigen erfindungsgemäßen Komplex oder eine Kombination aus mehreren erfindungsgemäßen Komplexen als Wirkstoff enthalten. Des Weiteren kann die pharmazeutische Zusammensetzung gegebenenfalls dem Fachmann hinreichend bekannte, herkömmlich verwendete pharmazeutische Zusatzstoffe enthalten, wie z.B. physiologisch verträgliche
25 Trägersubstanzen, Verdünnungsmittel und Hilfsmittel.

Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung kann in einer topisch, parenteral, intravenös, intramuskulär, subkutan oder transdermal verabreichbaren Form vorliegen und kann mit Hilfe von herkömmlichen, im
30 Stand der Technik gut bekannten Verfahren hergestellt werden. Vorzugsweise wird die erfindungsgemäße pharmazeutische

Zusammensetzung in Form von Tabletten oder als intravenöse Injektion bzw. Infusion hergestellt.

Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung wird zur
5 Behandlung von Tumoren eingesetzt. Die Bezeichnung "Tumor", wie hierin
verwendet, umfasst jede örtliche Zunahme des Gewebevolumens sowie
Zellen, bei denen die normale Wachstumsregulation nicht mehr greift und
die unregelmäßige Zellteilung stattfindet. Das heißt im weitesten Sinne jede
lokalisierte Anschwellung durch Ödem, akute und chronische Entzündung,
10 aneurysmatische Erweiterung und entzündlich bedingte Organschwellung,
sowie im engsten Sinne eine gewebliche Neubildung (z.B. Gewächs,
Blastom, Neoplasie) in Form eines spontanen, verschiedenartig
entstehenden, autonomen und irreversiblen Überschusswachstums von
körpereigenem Gewebe, das in der Regel mit unterschiedlich ausgeprägtem
15 Verlust spezifischer Zell- und Gewebefunktionen verbunden ist. Beispiele
für Tumorerkrankungen, die mit Hilfe der erfindungsgemäßen
pharmazeutischen Zusammensetzung behandelt werden können, umfassen
Darmkrebs, Hirntumor, Augentumor, Pankreaskarzinom,
Harnblasenkarzinom, Lungenkrebs, Brustkrebs, Ovarialtumor,
20 Gebärmutterkrebs, Knochentumor, Gallenblasen- und Gallengangskarzinom,
Kopf-Hals-Tumor, Hautkrebs, Hodenkrebs, Nierentumor, Keimzelltumor,
Leberkrebs, Leukämie, malignes Lymphom, Nerventumor, Neuroblastom,
Prostatakrebs, Weichteiltumor, Speiseröhrenkrebs sowie Karzinome bei
unbekanntem Primärtumor.

25 Die Bezeichnung "Behandlung von Tumoren", wie hierin verwendet,
umfasst wenigstens eines der folgenden Merkmale: eine Linderung der mit
der Tumorerkrankung verbundenen Symptome, eine Verringerung des
Ausmaßes der Tumorerkrankung (z.B. eine Reduktion des
30 Tumorwachstums), eine Stabilisierung des Zustandes der Tumorerkrankung
(z.B. eine Inhibierung des Tumorwachstums), eine Verhinderung einer
weiteren Ausbreitung der Tumorerkrankung (z.B. eine Metastasierung), eine

- 10 -

Verhinderung des Auftretens oder Wiederauftretens einer Tumorerkrankung, eine Verzögerung oder Verlangsamung des Verlaufs der Tumorerkrankung (z.B. eine Reduktion des Tumorwachstums) oder eine Verbesserung des Zustandes der Tumorerkrankung (z.B. eine Verkleinerung des Tumors).

Vorzugsweise wird die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung einem Patienten mit einer Tumorerkrankung in einer Menge verabreicht, die ausreichend ist, um eine Behandlung des entsprechenden Tumors zu erzielen. Die zu verabreichende Menge der pharmazeutischen Zusammensetzung hängt dabei von mehreren Faktoren ab, wie z.B. der Wahl des erfindungsgemäßen Komplexes (Spezifität, Wirksamkeit etc.), der Art der Verabreichung (Tablette, Injektion, Infusion etc.), der Art und dem Ausmaß der Tumorerkrankung und dem Alter, Gewicht und Allgemeinzustand des Patienten, und kann ohne weiteres von einem Fachmann auf dem Gebiet der Tumorerkrankung unter Berücksichtigung der oben genannten Faktoren bestimmt werden. Vorzugsweise werden die erfindungsgemäßen Komplexe jedoch im Bereich von 1 $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht des Patienten bis 5 mg/kg Körpergewicht des Patienten, vorzugsweise von 1 $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht des Patienten bis 0,5 mg/kg Körpergewicht des Patienten und besonders bevorzugt von 10 $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht des Patienten bis 0,1 mg/kg Körpergewicht des Patienten, verabreicht.

Die Verabreichung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung erfolgt topisch, parenteral, intravenös, intramuskulär, subkutan oder transdermal. Vorzugsweise wird die pharmazeutische Zusammensetzung in Form von Tabletten oder als intravenöse Injektion bzw. Infusion verabreicht. In einzelnen Fällen kann auch eine gezielte Einspritzung der pharmazeutischen Zusammensetzung in Körperhöhlen oder über einen Katheter in die Blutgefäße der Tumorregion bzw. des Organs, in dem der Tumor sitzt, erfolgen.

- 11 -

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines erfindungsgemäßen Komplexes zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumoren.

- 5 Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern in Verbindung mit den Abbildungen der beigefügten Zeichnung.

In den Zeichnungen stellen dar:

- 10 Abb. 1: Black-Linie-Maus mit Melanom B-16 nach Behandlung mit MOC-Melphalan, Tumorgewicht 0,3 g
- Abb. 2: Black-Linie-Maus mit Melanom B-16, Kontrollgruppe, Tumorgewicht 3,15 g
- 15 Abb. 3: DNS-Elektrophorese von Black-Linie-Mäusen mit Melanom B-16
2 MOC-Melphalan
4 Kontrollgruppe
1, 3 Referenzsubstanzen
- 20 Abb. 4: Wirkung der Substanz MOC-Melphalan auf die Kapselbildung des Tumors Melanom B-16 (100-fache Vergrößerung)
1 Parenchymfettzellen
25 2 epithelähnliche Zellen
3 Gefäß
4 Tumorgewebe
- 30 Abb. 5: Tumor Melanom B-16 in der Kontrollgruppe (100-fache Vergrößerung)
1 Muskelfaserpakete
2 Gefäß

Abb. 6: zeigt die präventive Wirkung der Substanz MOC·Melphalan auf den Tumor AKATON: Tumormasse und -volumen nach 4-maliger intravenöser Applikation von MOC·Melphalan vor Tumorimplantation

5

Abb. 7: zeigt ein Elektropherogramm der DNA von Zellen des Sarkom S-180 unter Einfluss der Substanz MOC·Melphalan in einer Dosierung von 0,05 mg/10⁶ Zellen

10

2 MOC·Melphalan, Inkubationszeit 40 Minuten

5 MOC·Melphalan, Inkubationszeit 60 Minuten

7 Kontrollgruppe

1, 3, 4, 6 Referenzsubstanzen

15

Abb. 8: Bildung der doppelschichtigen Hülle zwischen bösartigem und gesundem Gewebe durch die Wirkung der Substanz MOC·Tegafur

Abb. 9: Bildung von Hohlräumen in den Zellen unter Einwirkung der Substanz MOC·Tegafur

20

Abb. 10: Wirkung der Substanz MOC·Tegafur auf die Kapselbildung des Tumors Melanom B-16 (Vergrößerung 40 x 40):

25

1 epithelähnliche Zellen mit Anzeichen von Degradation

2 Zellen der Muskelfasern

3 Tumorgewebe

30

- 13 -

Abb. 11: Wirkung der Substanz MOC-Melphalan auf die Kapselbildung des Tumors Melanom B-16 (Vergrößerung: 10 x 10):

- 5
- 1 Parenchymfettzellen
 - 2 epithelähnliche Zellen
 - 3 Gefäß
 - 4 Tumorgewebe

Abb. 12: Tumor Melanom B-16 bei Tieren der Kontrollgruppe (Vergrößerung 10 x 10)

- 10
- 1 Gewebebündel der Muskeln
 - 2 Gefäße

Beispiele

15

Beispiel 1: Herstellung eines erfindungsgemäßen Komplexes am Beispiel von $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$

a) Synthese von $Cu(C_5H_7O_2)_2$

- 20
- Zu einer Lösung von 20,4 g $CuCl \times 2H_2O$ in 125 ml Wasser wurden 25 ml frisch destilliertes $C_5H_9O_2$, gelöst in 50 ml Methanol, unter ständigem Rühren gegeben. Dann wurde eine Lösung aus 20 g Natriumacetat in 75 ml Wasser zu dieser Mischung gegeben. Das so erhaltene Gemisch wurde im Wasserbad bis zum Sieden erhitzt und anschließend auf Zimmertemperatur
- 25
- abgekühlt. Das gebildete $Cu(C_5H_7O_2)_2$ wurde aus Methanol auskristallisiert. Einige Stunden nach der vollständigen Auskristallisation wurden die blauen $Cu(C_5H_7O_2)_2$ -Kristalle abfiltriert, mit Wasser gewaschen und bei einer Temperatur von 80 °C und einem Druck von 6 mm Hg vakuumgetrocknet.

b) Synthese des Komplexes $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$

Zu 0,01 Mol Cu $(C_5H_7O_2)_2$ in 20 ml Lösungsmittel wurden unter ständigem Rühren 20 ml einer 0,02 molaren Lösung aus $C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ (4-[Bis(2-chlorethyl)-amino]-L-phenylalanin) gegeben.

Variante 1: Das Glasgefäß mit der so erhaltenen Lösung wurde mit einem Polyethylenverschluss abgedichtet und für einige Tage zur langsamen Auskristallisation an einem dunklen Ort gelagert. Nach einigen Tagen wurden die grünen $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ -Kristalle abgetrennt und mehrere Male mit einem Lösungsmittel von physikalisch anhaftenden $C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ -Molekülen gereinigt. Danach wurden die $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ -Kristalle an der Luft getrocknet.

Variante 2: Die so erhaltene Lösung wurde in einem Rotationsverdampfer verdampft, wobei das Lösungsmittel unter Vakuumbedingungen (6 mm Hg) bei einer Temperatur von 40 °C abgesaugt wurde. Die grün gefärbten $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ -Kristalle wurden aus dem Glaskolben entnommen, mit Lösungsmittel gereinigt und an der Luft getrocknet.

Beispiel 2: Hydrolysestabilität der erfindungsgemäßen Komplexe am Beispiel von $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$

I. Hydrolysestabilität in Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung

0,6 g $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ wurden mit Hilfe eines Ultraschallgenerators (Frequenz: 15 kHz, 10 Minuten) in 100 ml Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung dispergiert. Die so erhaltene Lösung war über einen Zeitraum von 30 Tagen bei 20 °C stabil und zeigte in diesem Zeitraum keine Hydrolyse.

II. Hydrolysestabilität in Olivenöl

0,6 g $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ wurden mit Hilfe eines Ultraschallgenerators (Frequenz: 15 kHz, 10 Minuten) in 100 ml 100 %-

5 igem Olivenöl dispergiert. Die so erhaltene Lösung war über einen Zeitraum von mehr als 2 Jahren bei 20 °C stabil und zeigte keine Hydrolyse.

III. Hydrolysestabilität in Linolsäure oder Linolensäure

0,1 g $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ wurden mit Hilfe eines

10 Ultraschallgenerators (Frequenz: 15 kHz, 10 Minuten) in 100 ml Linolsäure oder Linolensäure dispergiert. Die so erhaltene Lösung wies eine hellgrüne Farbe auf und war an der Luft bei 20 °C über einen Zeitraum von 1 Jahr stabil.

15 Beispiel 3: Antitumorwirksamkeit der erfindungsgemäßen Komplexe

1) 10 Mäusen der Linie Balb, welche ein Adenokarzinom enthielten, wurde $Cu(acac)_2M$ intraabdominal in einer Dosis von 5 mg/kg in 0,3 ml physiologischer Kochsalzlösung verabfolgt. Zur Kontrolle wurden 10

20 weitere Mäuse der gleichen Art mit dem gleichen Tumor ohne Behandlung bestimmt. Bei den Kontrollmäusen wurde ein durchschnittliches Tumorgewicht von 3,60 g festgestellt, bei den behandelten Mäusen betrug das durchschnittliche Tumorgewicht 0,3 g. In der nachfolgenden Tabelle 1 sind die Ergebnisse bei den erfindungsgemäß behandelten Mäusen

25 angegeben mit Gewicht und Größe des Tumors. Im Vergleich zur Kontrollserie ergibt sich daraus eine 91,9 %-ige Hemmung des Tumors.

Tabelle 1

Mäuse	Gewicht des Tumors in g	Größe des Tumors cm
1	0	0
2	0	0
3	0,35	0,2 x 0,2 x 0,2
4	1,13	1,4 x 0,7 x 0,6
5	0,8	0,8 x 0,8 x 0,5
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0,49	0,3 x 0,2 x 0,2
10	verendet	-

Die nachstehende Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der Kontrollserie unbehandelter Mäuse mit ebenfalls Gewicht und Größe des Tumors angegeben. Das durchschnittliche Gewicht des Tumors betrug 3,60 g.

- 17 -

Tabelle 2

Mäuse	Gewichts des Tumors in g	Größe des Tumors cm
1	1,61	1,6 x 1,0 x 0,7
2	1,69	2,5 x 2,0 x 0,8
3	6,48	3,6 x 2,5 x 1,6
4	2,93	3,0 x 1,0 x 0,7
5	3,75	3,5 x 1,5 x 0,7
6	2,56	3,1 x 1,0 x 1,7
7	3,69	3,0 x 2,0 x 1,0
8	5,22	3,0 x 2,5 x 1,0
9	4,85	3,0 x 2,0 x 1,0
10	3,23	2,6 x 1,5 x 1,0

2. Antitumoraktivität bei Adenokarzinom und intravenöser Verabreichung (viermal in physiologischer Kochsalzlösung)

Die Ergebnisse zeigt die nachstehende Tabelle 3.

Tabelle 3

Präparate	Dosis des Präparates	Anzahl der Tiere	Masse des Tumors g	% der Hemmung
(Cu(acac) ₂ M	5 mg/kg	6	0,9	80
Kontrolle	-	6	4,4	

3. Antitumoraktivität bei Adenokarzinom, welcher nach Verabreichung des Präparates verpflanzt wurde.

- 18 -

Tabelle 4

Präparate	Dosis des Präparates	Anzahl der Tiere	Masse des Tumors g	% der Hemmung	Ausmaß des Tumors in cm ³	% der Hemmung
Cu(acac) ₂ M	5 mg/kg	6	0,91	80	1,38	82,5
Kontrolle		6	4,46		7,9	

Der erfindungsgemäße Wirkstoff wurde in physiologischer Kochsalzlösung von je 0,3 ml in der in der Tabelle angegebenen Dosierung 4 Tage hintereinander intravenös verabreicht. Danach wurde den Balb-Mäusen des Adenokarzinom eingepflanzt. 21 Tage nach Verpflanzung des Tumors wurden die Tiere getötet und Gewicht und Größe des Tumors registriert. Im Verlauf des Versuchs erhielten die Tiere keine sonstigen Arzneimittel und wurden bei normaler Futterration gehalten. Die Ergebnisse zeigen, dass der erfindungsgemäße Wirkstoff sich im Organismus anlagern kann und über eine prolongierende Wirkung verfügt.

4. Antitumoraktivität bei Sarkom C-180

In der nachstehenden Tabelle 5 sind die Ergebnisse von Versuchsreihen dargestellt, bei denen der angegebene Wirkstoff intraperitoneal in physiologischer Kochsalzlösung in der angegebenen Dosierung verabreicht wurde.

Tabelle 5

Präparat	Dosis des Präparates	Anzahl der Tiere	Masse des Tumors g	% der Hemmung
Cu(acac) ₂ M	5 mg/kg	6	Kein Tumor	100
Melfalan	5 mg/kg	10	2,4 ± 1,1	49
Kontrolle		10	2,8	

5. Wirksamkeit bei Leukämie

Die therapeutische Wirksamkeit wurde an Leukämietumorstämmen L-1210, P-388 und speziell auf Medikamentenresistenz erzielten Stämmen P-388 untersucht. Die Lebensdauer der Tiere wurde dabei mit 60 Tagen angesetzt. Medikamenten-resistente Tumor wurden erhalten durch aufeinanderfolgende Verpflanzung der Leukämie P-388 mit Asciteszellen, welche Mäusen entnommen wurden, die mit Rubomycin (Stamm P388/ph), Vinkristin (P388/vcr) und Zisplatin (P388/cPt) behandelt worden waren.

Die Resistenz gegenüber den genannten Präparaten stellte sich bei der 8-ten, 6-ten und 4-ten Generation ein. Die Untersuchungen ergaben, dass die Stämme P388/ph und P388/vcr über einen Phenotyp und einen Genotyp mit multifaktorieller Medikamentenresistenz verfügten.

Die Ergebnisse zeigen die nachfolgenden Tabellen 6, 7 und 8,

5a. Leukämie L-1210

Inokulum: 10^6 Zellen in 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung. Mäuse: BDF₁, Weibchen 19-21 g. Die Präparate wurden intraabdominös verabfolgt.

Nach Transplantation des Tumors wurde den Tieren die Substanz MOC-Melphalan intraabdominal in einer Dosierung von 5 mg/kg in 0,3 ml 10 %-iger Twin-80-Lösung an den Tagen 1 bis 7 verabreicht. Die Wirkung der Substanz wurde anhand der Lebensdauer und der Gewichtsveränderung der Tiere beurteilt (Tabelle 9). Die Beobachtungszeit betrug 60 Tage.

- 20 -

Tabelle 6

Präparat	Einmalige Dosis mg/kg	Regime der Verabfolgung Tage	Anzahl der Tiere im Experiment	% der überlebenden Tiere	Veränderung des Gewichts g	Lebensdauer der Tiere im Versuch (Tage)
Cu(acac) ₂ M	5	1-7	6	100	-1,5	> 60
Kontrolle	5	1-7	6	0	+0,7	8,5

5b. Leukämie P-388

Inokulum: 10⁶ Zellen in 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung. Mäuse: BDF₁. Weibchen 19-21 g

Nach Transplantation des Tumors wurde den Tieren die Substanz MOC-Melphalan intraabdominal in einer Dosierung von 5 mg/kg in 0,3 ml 10 %-iger Twin-80-Lösung an den Tagen 1 bis 7 verabreicht. Die Wirkung der Substanz wurde anhand der Lebensdauer und der Gewichtsveränderung der Tiere beurteilt (Tabelle 7).

Tabelle 7

Präparat	Einmalige Dosis mg/kg	Regime der Verabfolgung Tage	Anzahl der Tiere im Experiment	Anzahl der Tiere, die bis zum 60. Tag überlebt hatten	Durchschnittl. Lebensdauer, Tage	Zunahme der durchschnittl. Lebensdauer %	Veränderung des Gewichtes in g
Cu(acac) ₂ M	5	1-7	6	0	16,8	56,0	-2,5
Kontrolle			6	0	10,8	-	+1,6

Die Präparate wurden intraabdominal verabfolgt. Cu(acac)₂M war in 10 % Twin 80 aufgelöst.

- 21 -

Tabelle 8

5

Stamm	Präparat	Dosis mg/kg	Regime (Tage nach der Verpflanzung)	ILS %*	Anzahl der überlebenden Tiere/Anzahl der Tiere in der Gruppe
P-388** o.S. (Ausgangs- stamm)	Cu(acac) ₂ M	5	1-7	56	-
		10	1,5,9	419	5/6
		10	1,7	465	4/6
		15	1,7	447	5/6
Medikamentenresistente Tumore					

10

P388/ph	Cu(acac) ₂ M	5	1-7	189	2/6
P388/vcr		5	1-7	516	5/6
P388/cPt		5	1-7	193	-

* mittlere prozentuale Überlebenszeit

Bei der ILS-Bestimmung wurde der Referenzwert für die
Überlebensrate der Tiere auf 60 Tage festgelegt.

** o.S. - ursprünglicher Stamm, nicht resistent

pH - Rubomycin-resistenter Stamm

vcr - Vincristin-resistenter Stamm

cPt - Cisplatin-resistenter Stamm

Die arzneimittelresistenten Tumore wurden durch Verabreichung von
Aszites-Zellen Leukämie P-388 erhalten, die von Mäusen, welche mit
Rubomycin, Vincristin und Cisplatin behandelt wurden, stammen. Die
Resistenz wurde in der 4., 6. und 8. Generation gefunden. Die
Empfindlichkeit der resistenten Tumore wurde durch die Anwendung der
Substanz MOC"Melphala um das 4-5-fache gesenkt.

Wie aus den Tabellen 6 bis 8 zu entnehmen ist, wurden die
interessantesten Resultate bei Leukämie P-388 mit multifaktorieller
Medikamentenresistenz erzielt. Diese, auf zahlreiche Antitumormittel nur

- 22 -

schwach reagierenden Tumore, waren gegenüber dem erfindungsgemäßen Präparat sensibel.

Ebenso bemerkenswert ist die Wirkung gegenüber L-1210, da alle Tiere der
5 Versuchsgruppe 60 Tage nach der Transplantation des Tumors überlebten.
Eine solche Überlebensdauer entspricht ihrer völligen Ausheilung.

Beispiel 4: Immunmodulatorische Eigenschaften der erfindungsgemäßen Komplexe am Beispiel von $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$

10

Die immunmodulatorischen Eigenschaften des erfindungsgemäßen Komplexes $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ wurden anhand der Vermehrung der Antikörper-bildenden Zellen von weißen, rasselosen Mäusen (mittleres Gewicht: 20 g) bestimmt. Die Mäuse wurden intraperitoneal mit $2 \cdot 10^8$
15 Schaf-Erythrozyten in 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung immunisiert. Eine halbe Stunde nach erfolgter Immunisierung erhielten die Mäuse 0,3 mg/kg $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ in 0,6 ml Olivenöl peroral verabreicht. Nach 4 Tagen wurden die Tiere getötet, die Milz wurde entnommen, in Lösungsmittel homogen suspendiert und 0,5 ml der Suspension wurden auf
20 einer Petrischale mit Schaf-Erythrozyten auf einem Agar ausgestrichen. Die Experimente zeigten, dass $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ in einer Dosierung von 0,3 mg/kg Körpergewicht die Anzahl der Antikörper-bildenden Zellen in der Milz der immunisierten Tiere erhöhte. So betrug die Anzahl der Antikörper bildenden Zellen der Kontrollgruppe, der nur 0,6 ml Olivenöl
25 peroral verabreicht wurde, 76.000 ± 5.000 , während die Anzahl der Antikörper-bildenden Zellen der immunisierten Tiere 158.000 ± 7.000 betrug.

**Beispiel 5: Toxizitätsuntersuchungen der erfindungsgemäßen Komplexe am
30 Beispiel von $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$**

- 23 -

Die Toxizität des erfindungsgemäßen Komplexes $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ wurde an fünf Labortierarten in verschiedenen Tests bestimmt. Die Resultate der Untersuchungen zeigten, dass $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ in einer Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht keine schweren Veränderungen im peripheren Blutbild verursacht, keine pathologischen Einflüsse auf die Nieren- und Leberfunktion hat und in den Organen und Geweben keine spezifischen Veränderungen hervorruft. Zusätzlich konnte durch die Untersuchungen gezeigt werden, dass $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ selbst bei einer längeren Verabreichungsdauer keine Resistenzen hervorruft.

Beispiel 6: Antitumoraktivität bei Melanom B-16

Experiment I

Nach Transplantation des Tumors Melanom B-16 auf Mäuse der Black-Linie (Zellsuspension mit 10×10^6 Zellen/ml) wurde MOC-Melphalan intraabdominal in einer Dosierung von 5 mg/kg in 0,3 ml 10 %-iger DMSO-Lösung an den Tagen 3, 5 und 9 verabreicht. Die Tiere wurden am 21. Untersuchungstag getötet und histologisch, morphologisch untersucht (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9

Wirkung der Substanz MOC-Melphalan auf den Tumor Melanom B 16
Inhibierung der Tumorphiliferation

Gruppe	Dosierung in mg/kg	Zahl der Tiere	Durch- schnittliche Tumor- masse/g	Prozentuale Hemmung
MOC-Melphalan	5	5	-	100
Kontrolle	-	5	3,4	-

Experiment II

- 24 -

Nach Transplantation des Tumors Melanom B-16 auf Mäuse der Black-Linie (Zellsuspension mit 10×10^6 Zellen/ml) wurde die Substanz intraabdominal in einer Dosierung von 0,1 mg/Tier an den Tagen 3, 5 und 9 in der 0,3 ml 10 %-iger DMSO-Lösung verabreicht. Die Tiere wurden am 16. Untersuchungstag getötet und histologisch, morphologisch untersucht (Tabelle 10, Abbildungen 1, 2). Die DNS-Konzentration in den Tumorzellen wurde spektrophotometrisch nach der Elektrophorese bestimmt. (Tabelle 10, Abbildung 3).

10

Tabelle 10

Wirkung der Substanz MOC-Melphalan auf den Tumor Melanom B-16
Inhibierung der Tumorphiliferation, Zerstörung der Tumorzell-DNS

15

Gruppe	Dosierung mg/Tier	Zahl der Tiere	durchschn Tumor- masse/g	prozentuale Hemmung	DNS mg/g	Mitose- index
MOC-Melphalan	0,1	6	0,83	78	0,8	0,6
Kontrolle	-	6	3,22	-	4,3	4,2

Beispiel 7: Aktivität bei Sarkom S-180

20

Experiment I

25

Nach Transplantation des Tumors Sarkom S-180 auf weiße rasselose Mäuse wurde den Tieren die Substanz MOC-Melphalan intraabdominal in einer Dosierung von 1 mg/kg in 0,3 ml 10 %-iger DMSO-Lösung an den Tagen 3, 5 und 9 verabreicht. Die Tiere wurden am 21. Untersuchungstag getötet und histologisch, morphologisch untersucht (Tabelle 11).

- 25 -

Tabelle 11

Wirkung der Substanz MOC-Melphalan auf den Tumor Sarkom S-180
Inhibierung der Tumorphiliferation

5

Gruppe	Dosierung in mg/kg	Zahl der Tiere	durchschn. Tumormasse/ g	prozentuale Hemmung
MOC-Melphalan	1	6	-	100
Kontrolle	-	6	4,7	-

10 **Experiment II**

Nach Transplantation des Tumors Sarkom S-180 auf weiÙe rassellose
Mäuse wurde den Tieren MOC-Melphalan und Melphalan intraabdominal in
einer Dosierung von 5 mg/kg in 0,3 ml 10 %-iger DMSO-Lösung an den
Tagen 3, 5, 7 und 9 verabreicht. Die Tiere wurden am 21.
15 Untersuchungstag getötet und histologisch, morphologisch untersucht
(Tabelle 12).

Tabelle 12

Wirkung der Substanz MOC-Melphalan auf den Tumor Sarkom S-180
20 Inhibierung der Tumorphiliferation

25

Gruppe	Dosierung in mg/kg	Zahl der Tiere	durchschn. Tumormasse/g	prozentuale Hemmung
MOC-Melphalan	5	6	-	100
Melphalan	5	10	1,4	49
Kontrolle	-	10	2,8	-

Experiment III

Nach Transplantation des Tumors Sarkom S-180 auf weiÙe rassellose
Mäuse wurde den Tieren MOC-Melphalan und Melphalan intraabdominal in

- 26 -

einer Dosierung von 5 mg/kg in 0,3 ml 10 %-iger DMSO-Lösung an den Tagen 2, 4, 6, 8 und 10 verabreicht. Die Tiere wurden am 21. Untersuchungstag getötet und histologisch, morphologisch untersucht (Tabelle 13).

5

Tabelle 13

Wirkung der Substanz MOC-Melphalan auf den Tumor Sarkom S-180
Inhibierung der Tumorphiliferation

10

Gruppe	Dosierung in mg/kg	Zahl der Tiere	durchschn. Tumormasse/g	prozentuale Hemmung
MOC-Melphalan	5	10	2,0 ± 0,7	49
Melphalan	5	10	2,4 ± 1,1	38
Kontrolle	-	20	3,9 ± 0,5	-

15

Beispiel 8: Wirkung am Adenokarzinom des Dünndarms (AKATON)

Experiment I

Nach Transplantation des Tumors AKATON auf weiße rassellose Mäuse wurde den Tieren die Substanz MOC-Melphalan intraabdominal in einer Dosierung von 5 mg/kg in 0,3 ml physiologischer Lösung an den Tagen 3, 5, 7 und 9 verabreicht. Die Tiere wurden am 21. Untersuchungstag getötet und histologisch, morphologisch untersucht (Tabelle 14).

20

Tabelle 14

Wirkung der Substanz MOC-Melphalan auf den Tumor AKATON
Inhibierung der Tumorphiliferation bei intraabdominaler Applikation

5

Gruppe	Dosierung in mg/kg	Zahl der Tiere	durchschn. Tumormasse	prozentuale Hemmung
MOC-Melphalan	5	10	0,3	92
Kontrolle	-	10	3,6	-

10 **Experiment II**

Nach Transplantation des Tumors AKATON auf weiße rassellose Mäuse wurde den Tieren die Substanz MOC-Melphalan intravenös in einer Dosis von 5 mg/kg in 0,3 ml physiologischer Lösung an den Tagen 3, 5, 7 und 9 verabreicht. Die Tiere wurden am 21. Untersuchungstag getötet und
15 histologisch, morphologisch untersucht (Tabelle 15).

Tabelle 15

Wirkung der Substanz MOC-Melphalan auf den Tumor AKATON
20 Inhibierung der Tumorphiliferation bei intravenöser Applikation

Gruppe	Dosierung in mg/kg	Zahl der Tiere	durchschn. Tumormasse/ g	prozentuale Hemmung
MOC-Melphalan	5	6	0,9	80
Kontrolle	-	6	4,4	-

25

Experiment III

Untersuchung zur Tumorphiliferation der Substanz MOC-Melphalan

- 28 -

Mäusen der Balb-Linie wurde die Substanz MOC-Melphalan intravenös in Dosierungen von 2,5 mg/kg und 5 mg/kg in 0,3 ml physiologischer Lösung an vier aufeinanderfolgenden Tagen (1 x täglich) verabreicht. Am Tag 5 wurde den Tieren der Tumor AKATON implantiert. Die Tiere wurden am

5 21. Untersuchungstag getötet und histologisch, morphologisch untersucht (Tabelle 16, Abbildung 6).

Tabelle 16

Präventive Wirkung der Substanz MOC-Melphalan auf den Tumor AKATON

10 - Inhibierung der Tumorphroliferation

Gruppe	Dosierung mg/kg	Zahl der Tiere	durchschn. . Tumormasse/g	prozentuale Hemmung des Tumorgewichts	durchschn. Tumorum- volumen/cm ³	prozen- tuale Hemm- ung des Tumorum- volu- mens
MOC-Melphalan	5,0	6	0,91	80	1,38	82
MOC-Melphalan	2,5	6	2,67	40	4,76	40
Kontrolle	-	6	4,46	-	7,90	-

Beispiel 9: Bestimmung der DNA-Konzentration in Zellen von Mäusen mit Sarkom S-180 nach Einwirkung der Substanz MOC-Melphalan

20 Tumorzellen des Sarkom S-180 ($20 \cdot 10^6$ Zellen/Untersuchung) wurden 40 bzw. 60 min mit der Substanz MOC-Melphalan in einer Konzentration von $0,05 \text{ mg}/10^6$ Zellen, bei einer Temperatur von 37°C inkubiert (siehe Tabelle 16).

25 Die DNA-Konzentration wurde mit der Phenol-Chloroform-Methode nach MANIATIS bestimmt (Maniatis, Frin, Sämbruck Methoden der genetischen Technologie, Molekulare Klonierung, M.: MIR, 1984, Seite 479 ff.). Nach der Trennung von DNA und RNA wurde eine Phorese in 2,5 %-igem

30 Agarosegel durchgeführt (siehe Tabelle 16, Abbildung 7). Die Menge der

- 29 -

DNA wurde aus dem Verbrauch von RN-ase berechnet, d.h. die Daten geben die genaue Masse der DNA an.

Tabelle 17

5

Einfluss der Substanz MOC-Melphalan auf die DNA-Konzentration in Tumorzellen des Sarkom S-180

10

Gruppe	Inkubationszeit /min	Dosierung mg/10 ⁶ Zellen	DNA- Konzentration µg/g Zellen	DNA- Konzentration/ Kontrolle
MOC-Melphalan	40	0,05	530	498
MOC-Melphalan	60	0,05	53	50
Kontrolle	-	-	106	100

15 Beispiel 10: Synthese des Komplexes Cu (acac)₂·Tegafur

Der Komplex Cu(acac)₂·Tegafur wurde durch langsame Auskristallisation aus einer Chloroform-Methanol-Lösung, angesäuert mit Salzsäure, erhalten.

20 *Herstellung:* 2,61 g (1 x 10⁻² mol) Kupfer-Acetylacetonat Cu(C₅H₇O₂)₂ werden in 50 ml gereinigtem Chloroform gelöst. Die Lösung hat eine dunkelblaue Farbe. 4 g (2 x 10⁻² mol) Tegafur (N¹-(2-Furanidil)-5-Flururacil) werden in 50 ml Chloroform-Methanol-Lösung im Verhältnis 1:1 gelöst. Die erhaltenen Lösungen wurden im Wasserbad bis zum Sieden erhitzt und

25 unter ständigem Rühren mit Hilfe eines Magnetrührers zusammengegeben. Die Lösung nimmt eine leuchtend grüne Farbe an. Das Glasgefäß mit der Lösung wird an einen dunklen Platz zur langsamen Auskristallisation deponiert. 3 bis 4 Tage nach der vollständigen Verdampfung des Lösungsmittels wird der braun-grüne Rückstand mit Chloroform bis zum

30 vollständigen Auswaschen des nicht reagierten Cu(C₅H₇O₂)₂ und Tegafur gereinigt. Die zurückgebliebenen grünen Kristalle werden an der Luft getrocknet.

- 30 -

Aufbau und Struktur: des Komplexes MOC-Tegafur wurden anhand der Methoden EPR, NMR, Elektronen- und Infrarotspektroskopie durchgeführt.

Charakterisierung der Verbindung MOC-Tegafur

5

Das Produkt stellt einen polykristallinen, metallorganischen Komplex dar, der eine grüne Farbe besitzt. Das stöchiometrische Verhältnis $\text{Cu}(\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2)_2$:Tegafur beträgt 1:1. Die Molekularmasse des Komplexes $\text{Cu}(\text{acac})_2$:Tegafur beträgt 461,2 g/mol, der Komplex löst sich gut in Wasser, in physiologischer Lösung, in Methanol, Ethanol, DMSO und Twin-
10 80. Die Verbindung ist nicht löslich in Ether und Chloroform. Die Schmelztemperatur der Kristalle beträgt 127 °C. Die Verbindung ist an der Luft über 5 Jahre stabil.

15 *Spektroskopische Parameter von MOC-Tegafur*

UV-Spektren (Lösung: Methanol-Chloroform, Verhältnis: 1:3):

UV-VIS-Spektrum: -UV-Bereich: Intensitätslinien bei 36200 cm^{-1} (276 nm)

-VIS-Bereich: charakteristischer Übergang von $d_{x^2-y^2}^2 \rightarrow$

20 d_{xy} bei $\lambda = 12345 \text{ cm}^{-1}$ (810 nm)

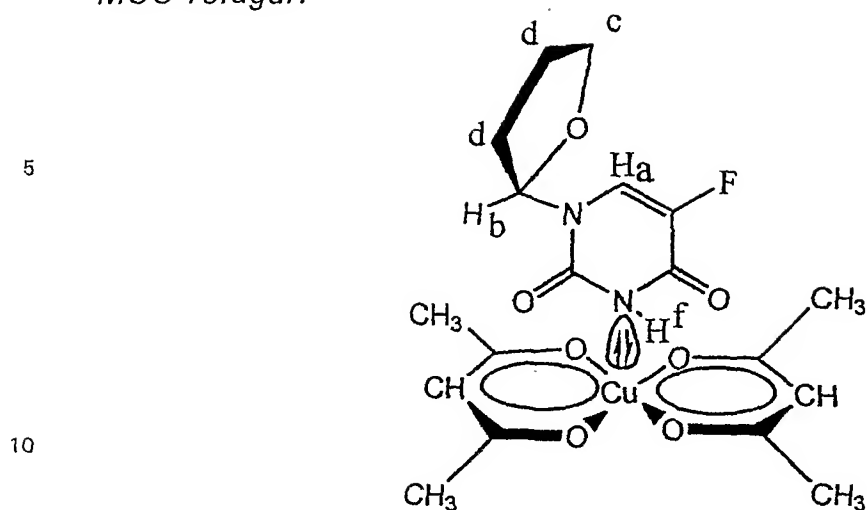
ESR-Spektren: Methanol-Chloroform-Lösung im Verhältnis 1:3 bei Raumtemperatur und Temperatur von 77 °K:

$$g_{\parallel} = 2,301, g_{\perp} = 2,05, g_o = 2,146$$

25 $A_{\parallel} = 160 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}, A_{\perp} = 14 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}, A_o = 52 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$

NMR-Spektren in deuteriertem Methanol-Chloroform (1:3): In der Tabelle sind die Werte der chemischen Verschiebung der Protonen im NMR-Spektrum des Komplexes MOC-Tegafur und des reinen Tegafur zum
30 Vergleich (a, b, c, d, f entsprechen der Protonenlage) angegeben.

- 31 -

MOC·Tegafur:

Werte der chemischen Verschiebung der Protonen bei den Substanzen
Tegafur und MOC·Tegafur

15

Tabelle 18

Substanz	a	b	c	g	f
Tegafur	7,8	5,8	3,7; 4,1	2,0	-
MOC·Tegafur	7,82	5,86	4,15	1,9	11,73

20

Beispiel 11: Antitumorwirkung von MOC·Tegafur**Experiment I:**

25 48 Stunden nach der Transplantation des Tumors AKATON
(Adenokarzinom Dünndarm) wurde den Mäusen der Balb-Linie die Substanz
MOC·Tegafur intraabdominal in 0,3 ml einer physiologischen Lösung in
einer Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Dies erfolgte am
3., 5., 7. und 9. Tag. Die Tiere wurden am 21. Untersuchungstag getötet.

30

Tabelle 19

Einfluss der Substanzen MOC-Tegafur und Tegafur auf den Tumor
 5 AKATON (viermalige Verabreichung der Substanzen)

	Dosis (mg/kg)	Anzahl der Tiere	Tumorgewicht (g)	prozentuale Hemmung*
MOC-Tegafur	5	10	0,61	86
Tegafur	250	10	1,95	54,5
10 Tumorkontrolle	-	10	4,4	-

* im Vergleich zur Kontrollgruppe

Experiment II:

15 48 Stunden nach der Transplantation des Tumors AKATON wurde den
 Mäusen der Balb-Linie die Substanz MOC-Tegafur intravenös in 0,3 ml
 einer physiologischen Lösung verabreicht. Dies erfolgte am 3., 5., 7. und
 9. Tag. Die Tiere wurden am 21. Untersuchungstag getötet.

20 Tabelle 20

Einfluss der Substanzen MOC-Tegafur und Tegafur auf den Tumor
 AKATON bei intravenöser Verabreichung (viermalige Verabreichung der
 Substanzen)

	Dosis (mg/kg)	Anzahl der Tiere	Tumorgewicht (g)	prozentuale Hemmung*
MOC-Tegafur	5	10	0,86	80
Tegafur	250	10	2,1	51
25 Tumorkontrolle	-	10	4,3	-

* im Vergleich zur Kontrollgruppe

Experiment III:

48 Stunden nach der Transplantation des Tumors Sarkom-180 wurde
 5 Mäusen der Balb-Linie die Substanz MOC-Tegafur intraabdominal in 0,3 ml
 einer physiologischen Lösung verabreicht. Die Verabreichung erfolgte am
 3., 5. und 9. Tag. Die Tiere wurden am 21. Untersuchungstag getötet.

Tabelle 21

10 Einfluss der Substanzen MOC-Tegafur und Tegafur auf den Tumor Sarkom-
 180 (dreimalige Verabreichung der Substanzen)

	Dosis (mg/kg)	Anzahl der Tiere	Tumorgewicht (g)	prozentuale Hemmung*
MOC-Tegafur	3	6	0,43	89
15 MOC-Tegafur	5	6	0,195	95
Tegafur	250	10	3,1	20,5
Kontrolle	-	6	3,9	-

* im Vergleich zur Kontrollgruppe

Beispiel 11: Untersuchung des Einflusses von MOC-Tegafur auf die AKATON-Tumorproliferation nach der Transplantation des Tumors

Das Präparat wurde intravenös in einer physiologischen Lösung von 0,3 ml
 25 4 Tage hintereinander verabreicht (Tabelle 20). Danach wurde der Tumor
 AKATON transplantiert.

Tabelle 22

Einfluss von MOC-Tegafur auf die Tumorproliferation bei den
 5 Untersuchungen am AKATON

	Dosis (mg/kg)	Anzahl der Tiere	Tumor- gewicht (g)	Prozentuale Hemmung des Tumor- gewichts	Größe des Tumors (cm ³)	Prozentuale Hemmung des Tumor- volumens
MOC-Tegafur	5	6	2,20	50*	3,06	61,3*
Kontrolle	-	6	4,46	-	7,90	-

10 * im Vergleich zur Kontrollgruppe

**Beispiel 12: Strukturmorphologische Änderungen im Tumorgewebe bei
 Mäusen mit Sarkom-180 durch Einwirkung von MOC-Tegafur**

15 Geschlechtsreifen rasselosen Mäusen wurde der Tumor Sarkom-180 mit
 einem Gewicht von 20 bis 22 g transplantiert. 48 Stunden nach der
 Transplantation des Tumors Sarkom-180 wurde den Mäusen die Substanz
 MOC-Tegafur intraabdominal in 0,9 % NaCl-Lösung in einer Dosierung von
 20 5 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Die Verabreichung erfolgte am 3., 5.
 und 9. Tag.

Am 21. Tag wurden die Mäuse durch Dekapitation getötet und das
 Tumorgewebe für die histologische Untersuchung entnommen. Die
 25 Antitumoraktivität von MOC-Tegafur wurde vorläufig bestimmt. Die
 prozentuale Hemmung der Tumorproliferation bei dieser Untersuchung
 betrug 96,4 %.

Die morphologische Struktur der histologischen Tumorschnitte bei den
 30 Tieren, die MOC-Tegafur erhielten, unterscheidet sich von den Tumoren

der Tiere in der Kontrollgruppe. Zum einen bildet sich zwischen dem gesunden und Tumorgewebe eine doppelschichtige Hülle, die mit einer Kapsel vergleichbar ist. Außen besteht sie aus Muskelfasern, im Inneren sind Zellen mit Membranen zu erkennen. Die Zellen sind meist ohne Inhalt
5 (Abbildung 8). Zweitens ist eine große Zahl von Hohlräumen verschiedener Größen vergleichbar mit Vakuolen zu erkennen (Abbildung 9).

Im Tumorgewebe der mit MOC behandelten Tiere sind hochdifferenzierte Zellen und nekrotische und postnekrotische Zonen zu beobachten, sowie
10 Blutgefäße, die eine große Zahl an Zellen enthalten. Die Tumorzellen sind meist rund mit kleinen Kernen (1 oder 2 Kerne) und enthalten kleinkerniges, kleinvernetztes, diffus verteiltes Chromatin. Wenige der großen Blastzellen sehen rund aus. Das Zytoplasma, das den großen Kern umgibt, ist nicht gleichmäßig verteilt. Das zahlreiche, umschlingende Chromatin konzentriert
15 sich auf die Kernperipherie. Die Anzahl der mehrkernigen Zellen weist auf eine Störung der Zytokinese hin. In den blasttransformierten Zellen ist eine frühzeitige Kondensation des Chromatins zu beobachten.

Bei der Untersuchung wurde die Aktivität des Tumorgewebes bei Tieren, die das Präparat MOC-Tegafur erhielten und bei unbehandelten Tieren in der Kontrolle bestimmt. Es wurde die Anzahl von Mitosen und Mitoseindex berechnet. Die mittlere Zahl der Mitosen in der Untersuchungsgruppe betrug 2,55 % und in der Kontrolltiergruppe 11,2 %. Der Mitoseindex in diesen Tiergruppen betrug 0,9 und 4,75. Bei der Untersuchung wurde
25 unter dem Mikroskop eine Zunahme der Zahl an pathologischen Metaphasen und Anaphasen beobachtet.

Zusammenfassend ergibt sich daraus, dass das Präparat MOC-Tegafur eine große destruktive Veränderung im Tumorgewebe hervorruft.

30

Beispiel 13: Einfluss von MOC-Melphalan und MOC-Tegafur auf den Tumor Melanom B-16

- 36 -

48 Stunden nach der Transplantation des Tumors Melanoms B-16 bei Mäuse der Linie Black wurden die Substanzen MOC-Melphalan und MOC-Tegafur in der Dosierung von 3 mg/kg Körpergewicht intraabdominal (im Folgenden an den Tagen: 3, 5 und 9) verabreicht. Unter Berücksichtigung der schlechten Wasserlöslichkeit von MOC-Melphalan wurden es in 10 % DMSO-Lösung (aufgefüllt mit 0,15 molarer NaCl) gelöst. MOC-Tegafur wurde in einer physiologischen Lösung verabreicht. Den Tieren der Kontrollgruppe wurden die Lösungen ebenfalls verabreicht (ohne Präparate). Am 16. Tag wurden die Mäuse durch Dekapitation getötet, Tumorgewebe für die histologische Untersuchung entnommen und der Tumor auf Antitumoraktivität untersucht (Tabelle 23). Die Fixierung der Tumore erfolgte mit 10 %-Formalin und danach wurde eine Paraffineinbettung durchgeführt. Die Schnittdicke von 5 μ m wurden mit Hämatoxylin-Eosinom gefärbt. Die Mikroskopie wurde mit einem Leica Galen-Mikroskop durchgeführt.

Die Untersuchungsergebnisse dieser Verbindungen, die in der Tabelle 23 zusammengestellt sind, deuten auf eine hohe Antitumoraktivität hin.

Tabelle 23

	Anzahl der Tiere	Dosis mg/kg	Tumor- gewicht g	prozen- tuale Hemmung*	MI (Mitose -index)
MOC-Tegafur	5	5,0	1,13	65,66	0,86
MOC-Melphalan	5	5	0,74	77,71	0,64
Kontrolle	5		3,22		4,22

* im Vergleich zur Kontrollgruppe

Bei der Einwirkung auf den Tumor wirken die Substanzen im logarithmischen Proliferationsstadium nicht nur auf die Größe und das Gewicht der Tumore, sondern sie inhibieren außerdem die Teilungsprozesse und die Lebensfähigkeit der Tumorzellen.

- 37 -

Bei den Tiergruppen, die die Substanzen MOC-Melphalan und MOC-Tegafur erhielten, wurde eine Hemmung der Tumorphiliferation beobachtet, aber auch die Anzahl der Mitosezellen war geringer (Tabelle 21).

5

Morphologisch sind diese Wirkungsbesonderheiten der Verbindungen deutlich zu sehen. Bei der Mikroskopie der Tiertumore (die Tiere, die MOC-Tegafur erhalten haben (Abbildung 10)) ist eine Kapselformmierung zu beobachten. Innerhalb der Kapseln sind verschiedene Zelltypen
10 erkennbar: zum einen epithelähnliche Zellen mit der Degradation und zum anderen Muskelzellen. Weiterhin ist Tumorgewebe zu erkennen. Im Tumorgewebe ist eine große Anzahl an nekrosen Zonen zu beobachten. Die Tumorzellen sind hochdifferenziert, mit verschiedenen Zellkernen. Das Chromatin ist meist großkernig, kleinvernetzt, man kann auch Zellen mit
15 viel Chromatin sehen. Die Zahl der teilbaren Zellen ist gering (MI beträgt 0,86).

Ein anderes Bild der morphologischen Struktur ist im Tumorgewebe bei den Tieren zu beobachten, die MOC-Melphalan erhalten haben (Abbildung 11).
20 Die Oberschicht der Kapsel ist in diesem Fall wesentlich größer, gleichartiger und besteht aus den Parenchymfettzellen. Gleichartige Zellen sind an der Vorgrenze vom Tumorgewebe zu erkennen. Im Zentrum des Tumors sind kerotische Abschnitte und Streifen zu beobachten. Man kann auch die Zerstörungen bei den Interzellkontakten sehen. Die Tumorzellen
25 haben meist wenig Zytoplasma, die Kerne sind verzerrt und enthalten ein körniges Chromatin. Die Zahl der teilbaren Zellen ist gering. Man erkennt eine kleine Zahl mit großen transformierten Kernen. Im Tumorgewebe sind auch alveoläre Strukturen vorhanden, die sich aus den antitypischen melanoblastomen-epithelähnlichen Typen formieren.

30

Bei den Tiertumoren der Kontrollgruppe bleibt die Kapselbildung aus (Abbildung 12). Die Außenschicht besteht aus Muskelbündeln, die sich in

der Mehrzahl im Tumorgewebe befinden. Die meisten aktiv teilbaren Tumorzellen zeigen überwiegend einen normalen Mitoseverlauf. Die Kerne sind groß und enthalten verschiedenartiges Chromatin. Kleine nekrotische Zellen trifft man selten.

5

Die vergleichende Analyse der morphologischen Bilder der drei Tiergruppen lässt darauf schließen, dass die erfindungsgemäßen Komplexe über eine gezielte Wirkung auf die Tumorgewebe verfügen. Trotz der Unterschiede in der morphologischen Struktur, der Einwirkungstendenz der Präparate auf die Tumordegradation ist folgendes Gleich: Verkapselung, wesentliche Degradation des Chromatins, Gewebeaufteilung, Senkung der proliferativen Zellaktivität.

10

Beispiel 14: Einwirkung auf Zellkulturen

15

Es wurde die Wirkung der erfindungsgemäßen Substanzen MOC-Melphalan und MOC-Tegafur auf die proliferative Aktivität, Morphologie und Proteinsynthese an den Tumorzellkulturen (KML) untersucht. Dies erfolgte bei den aus der Linie Melanom-16 ausgesonderten Mäusen. 80.000 Zellen/ml wurden in 3 ml DMEM mit dem Zusatz von embryonalem Kälberserum, 200 μ /mol des Glutamine und Antibiotikum, verteilt. Nach der Zellkultivierung von 24 Stunden bei einer Temperatur von 37 °C (Logarithmische Zellen-Wachstums-Phase) wurden die MOC-Substanzen in der Konzentration von 10 und 100 μ g/ml zugegeben. Nach der 24-stündigen Inkubation wurde die Zahl der lebendigen Zellen bestimmt. Parallel wurden die fixierten Präparate der Zellen für die morphologische Analyse vorbereitet.

20

25

Alle zwei MOC-Substanzen in der Konzentration von 100 μ g/ml rufen die Unterdrückung des Tumorwachstums (Tabelle 24) und ein weiteres Absterben der Tumorzellen hervor.

30

Tabelle 24

Untersuchungen zur Zellproliferationsunterdrückung durch Einwirkung von MOC-Tegafur und MOC-Melphalan

5

	Dosis ($\mu\text{g/ml}$)	Unterdrückung* der Wachstumszellen (%)
MOC-Tegafur	100	100
	10	32
MOC-Melphalan	100	95
	10	30

* im Vergleich zur Tumorkontrolle

10

Die morphologische Analyse hat gezeigt, dass bei der Dosierung von 10 $\mu\text{g/ml}$ MOC-Tegafur eine Ansammlung von Hyperchromie- und pyknotischen Zellen hervorruft. MOC-Melphalan führt zu der Zellenbildung mit Zytoplasma, ähnlich einer Vakuole.

15

Die Wirkung der Substanzen auf die Proteinsynthese bestimmt man mit Hilfe des Unterdrückungsstadiums durch den Einschluss der radioaktiven Präkursoren der Aminosäuren (summierte Mischung ^3H -Aminosäuren). Dafür wurden 1 Million Zellen, die sich in einer "log-Phase" befinden, ausgewählt.

20

In die 10 ml Flaschen wurden die Komplexe in der Dosierung von 50 $\mu\text{g/ml}$ und parallel die Aminosäuren mit einer Aktivität von 10 mCi/ml eingetragen. Nach der 24-stündigen Inkubation wurden die Zellen von dem Kultivierungsnährboden ausgewaschen und eine Lysis (Auflösung) durchgeführt. Die Radioaktivität der Proteine wurde mit dem Zellzählgerät

25

bestimmt (Tabelle 25).

Tabelle 25

Wirkung von MOC-Tegafur und MOC-Tegafur auf die Proteinbiosynthese

	Dosis ($\mu\text{g/ml}$)	Unterdrückung des Aminosäureeinschlusses (%)
MOC-Tegafur	50	77
MOC-Melphalan	50	59

* im Vergleich zur Kontrolle (Tumorzellkulturen)

Die Senkung der Proteinsynthese in den Zellen bei den untersuchten Gruppen wurde im Vergleich zu der Kontrollgruppe der Zellen bestimmt. Wie aus Tabelle 25 ersichtlich ist, inhibiert besonders MOC-Tegafur die Proteinbiosynthese.

Die Einwirkung der MOC-Substanzen auf die Tumorzellkulturen mit Melanom B-16 führt zur Änderung der morphologischen Struktur, Senkung der proliferativen Aktivität und Inhibierung der Proteinsynthese. Diese wird durch die Untersuchungsergebnisse bestätigt, die zuvor durch Einwirkung der Komplexe auf den Tumor B-16 bei den Mäusen erhalten wurden.

Beispiel 15: Pharmakokinetik der Speicherung von MOC-Präparaten in den Geweben des Organismus

Die Chemotumorthherapie verlangt eine selektive Wirkung von Antikrebspräparaten. Zu der Selektivität kann die Speicherungsfähigkeit der Präparate im Tumorgewebe gerechnet werden. Für die Bestimmung wurden speziell markierte $^3\text{H-Cu}(\text{acac})_2$ mit Tegafur synthetisiert. Das markierte Präparat wurde sorgfältig mit Hilfe eines Chromatogrammen von Begleitstoffen gesäubert. Die gesamte Radioaktivität des $^3\text{H-Cu}(\text{acac})_2\text{Ft}$ beträgt 0,16 Mikroeinheiten.

Die Verteilung und Speicherung des gekennzeichneten Komplexes in den Organen und Geweben wurde an Mäusen mit transplantiertem AKATON (Dünndarmkrebs) untersucht. Das Präparat wurde in einer Dosierung von 1.200.000 Impulsen pro Minute am 13. Tag nach der Tumortransplantation verabreicht. Es wurden drei Gruppen von Mäusen von je 5 Stück gebildet. Die Tiere wurden 30, 60 und 180 Minuten nach der Präparat-Verabreichung getötet und anhand der radioaktiven Impulse mit einem β -Zähler wurden die Organe untersucht (β -Szintigraphie). Die Ergebnisse sind in Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26

Speicherungsverlauf des $^3\text{H-Cu}(\text{acac})_2$ -Tegafur in Organen und Geweben bei den untersuchten Mäusen (Impulsanzahl pro Minute)

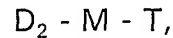
Organe	30 min	60 min	180 min
Gehirn	600	1200	500
Herz	Spuren	Spuren	-
Lunge	2300	2800	3000
Leber	1700	3550	4000
Niere	Spuren	Spuren	1200
Dünndarm	Spuren	Spuren	3200
Milz	1400	1200	1900
Blut	3300	4700	1200
Tumor	1200	1800	12.000

Die maximale Speicherung des Präparates wird im Tumor beobachtet, dies belegt einen gezielten Transport im Organismus.

Ansprüche

1. Komplex der allgemeinen Formel

5



wobei

D ein β -Diketon darstellt,

10

M ein Metallatom, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Cr, Cu, Mn, Fe, Ni, Co, Zn und Mo darstellt,

T eine Substanz mit mindestens einer N-, O- oder S-enthaltenden Gruppe darstellt und

wobei M mit T in einer Elektronen-Donor-Akzeptor-Wechselwirkung steht und M im Komplex eine freie Koordinationsstelle aufweist.

15

2. Komplex nach Anspruch 1,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,

dass D ausgewählt ist aus Acetylaceton und dessen höheren Alkylanalogen, Dibenzoylmethan und Diethyldithiocarbamin.

20

3. Komplex nach Anspruch 1 oder 2,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,

dass T eine Substanz mit mindestens einer NH_2 -, NH -, N-, O- oder S-Gruppe ist.

25

4. Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 3,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,

dass T eine Substanz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 2,4-Dihydroxy-5-fluorpyrimidin, 5-Fluor-1-(tetrahydro-2-furyl)-uracil (Tegafur), 2-[Bis-(2-chlorethyl)-amino]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazephosphorin-2-oxid, 1,2-Imidopropylsäureamid, 2-

30

- 43 -

Hydroxymethyl-5-hydroxy- γ -pyrone, 2,4,6-Trimethylpyridin, 2,4,6-Tri-2-pyridyl-1,3,5-triazin, 4-[Bis-(2-chlorethyl)-amino]-L-phenylalanin, 2-(3-Pyridyl)-piperidin, 2-2'-Bipyridin, 2-Methyl-(5-trimethyl-butyl-1-il-ol-3)-pyridin, 2-Methyl-(3-dimethyl-amino-1-propinyl)-pyridin und 2-Methyl-5-ethylen-pyridin, ist.

5. Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
 dass D Acetylaceton, M Cu und T eine Substanz, ausgewählt aus
10 der Gruppe, bestehend aus 2,4-Dihydroxy-5-fluorpyrimidin, 5-Fluor-1-(tetrahydro-2-furyl)-uracil (Tegafur), 2-[Bis-(2-chlorethyl)-amino]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazephosphorin-2-oxid, 1,2-Imidopropylsäureamid, 2-Hydroxymethyl-5-hydroxy- γ -pyrone, 2,4,6-Trimethylpyridin, 2,4,6-Tri-2-pyridyl-1,3,5-triazin, 4-[Bis-(2-chlorethyl)-amino]-L-phenylalanin, 2-(3-Pyridyl)-piperidin, 2-2'-Bipyridin, 2-Methyl-(5-trimethyl-butyl-1-il-ol-3)-pyridin, 2-Methyl-(3-dimethyl-amino-1-propinyl)-pyridin und 2-Methyl-5-ethylen-pyridin,
15 ist.

20 6. Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
 dass D Acetylaceton, M Mn und T eine Substanz, ausgewählt aus
 der Gruppe, bestehend aus 2,4,6-Trimethylpyridin, 2,4,6-Tri-2-pyridyl-1,3,5-triazin, 2-2'-Bipyridin, 2-(3-Pyridyl)-piperidin, 1,2-Imidopropylsäureamid und 4-[Bis-(2-chlorethyl)-amino]-L-phenylalanin, ist.

7. Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
30 dass er eine Antitumorwirksamkeit aufweist.

- 44 -

8. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend mindestens einen Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 7.
- 5 9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 8 zur Behandlung von Tumoren.
10. Verwendung eines Komplexes nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumoren.

10

GEÄNDERTE ANSPRÜCHE

[beim Internationalen Büro am 03 Dezember 2002 (03.12.02) eingegangen;
ursprüngliche Ansprüche 1-10 durch; neue Ansprüche 1-9 ersetzt (3 Seiten)]

1. Pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend mindestens einen Komplex der allgemeinen Formel



worin

D ein β -Diketon darstellt,

M ein Metallatom, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Cr, Cu, Mn, Fe, Ni, Co, Zn und Mo darstellt,

T eine Substanz mit mindestens einer N-, O- oder S-enthaltenden Gruppe darstellt und

wobei M mit T in einer Elektronen-Donor-Akzeptor-Wechselwirkung steht und M im Komplex eine freie Koordinationsstelle aufweist.

2. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass D ausgewählt ist aus Acetylaceton, Dibenzoylmethan und Diethyldithiocarbamin.
3. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass T eine Substanz mit mindestens einer NH_2 -, NH -, N -, O - oder S -Gruppe ist.
4. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
 dass T eine Substanz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 2,4-Dihydroxy-5-fluorpyrimidin, 5-Fluor-1-(tetrahydro-2-furyl)-uracil, 2-[Bis-(2-chlorethyl)-amino]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazephosphorin-2-oxid, 1,2-Imidopropylsäureamid, 2-Hydroxymethyl-5-hydroxy- γ -pyrone, 2,4,6-Trimethylpyridin, 2,4,6-Tri-2-pyridyl-1,3,5-triazin, 4-[Bis-(2-chlorethyl)-amino]-L-phenylalanin, 2-(3-Pyridyl)-piperidin, 2-2'-Bipyridin, 2-Methyl-(5-trimethyl-butyl-1-il-ol-3)-pyridin, 2-Methyl-(3-dimethyl-amino-1-propinyl)-pyridin und 2-Methyl-5-ethylen-pyridin, ist.

5. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
 dass D Acetylaceton, M Cu und T eine Substanz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 2,4-Dihydroxy-5-fluorpyrimidin, 5-Fluor-1-(tetrahydro-2-furyl)-uracil, 2-[Bis-(2-chlorethyl)-amino]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazephosphorin-2-oxid, 1,2-Imidopropylsäureamid, 2-Hydroxymethyl-5-hydroxy- γ -pyrone, 2,4,6-Trimethylpyridin, 2,4,6-Tri-2-pyridyl-1,3,5-triazin, 4-[Bis-(2-chlorethyl)-amino]-L-phenylalanin, 2-(3-Pyridyl)-piperidin, 2-2'-Bipyridin, 2-Methyl-(5-trimethyl-butyl-1-il-ol-3)-pyridin, 2-Methyl-(3-dimethyl-amino-1-propinyl)-pyridin und 2-Methyl-5-ethylen-pyridin, ist.

6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
 dass D Acetylaceton, M Mn und T eine Substanz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 2,4,6-Trimethylpyridin, 2,4,6-Tri-2-pyridyl-1,3,5-triazin, 2-2'-Bipyridin, 2-(3-Pyridyl)-piperidin, 1,2-Imidopropylsäureamid und 4-[Bis-(2-chlorethyl)-amino]-L-phenylalanin, ist.

7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
dass er eine Antitumorwirksamkeit aufweist.
8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Behandlung von Tumoren.
9. Verwendung eines Komplexes nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumoren.

1/12

Abb. 1



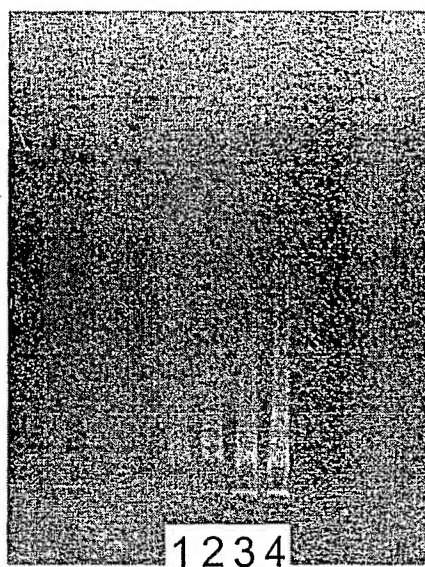
2/12

Abb. 2



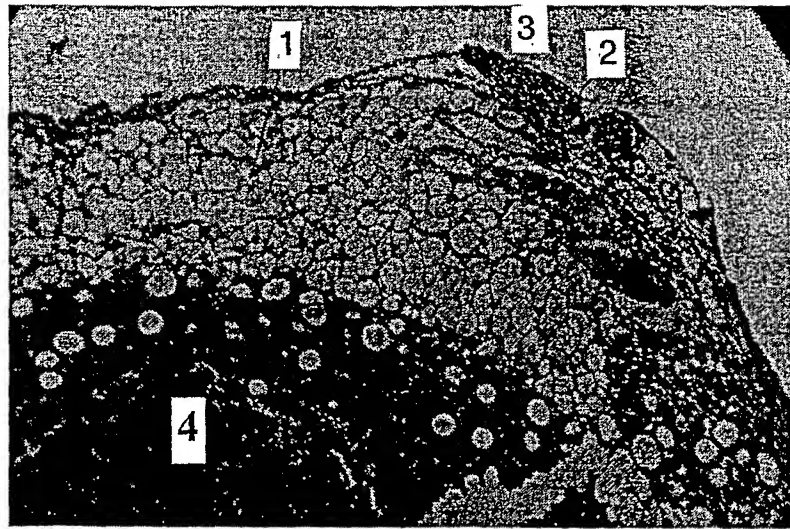
3/12

Abb. 3



4/12

Abb. 4

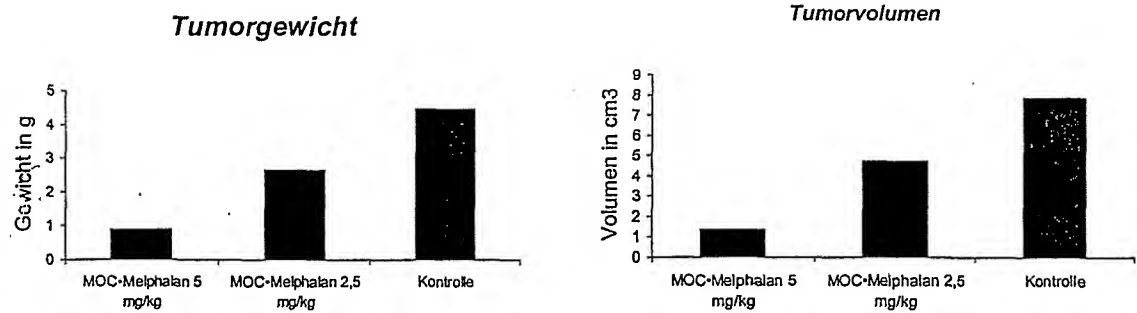


5/12

Abb. 5

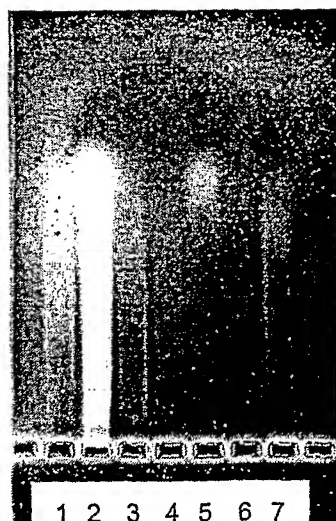


Abb. 6



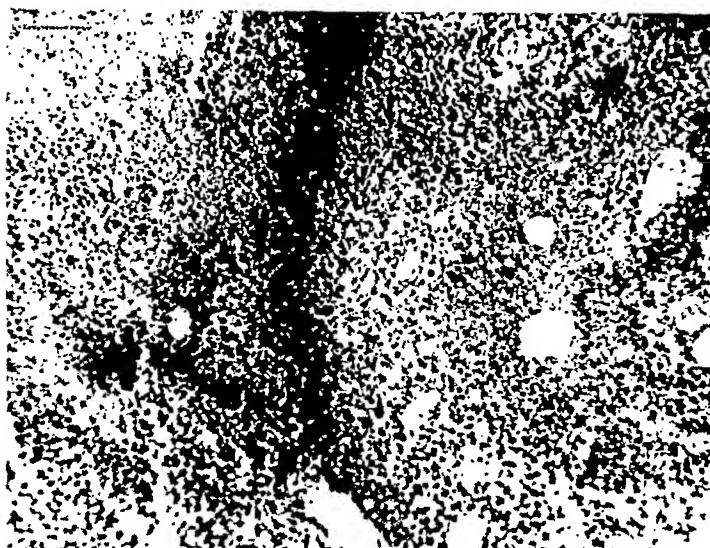
7/12

Abb. 7



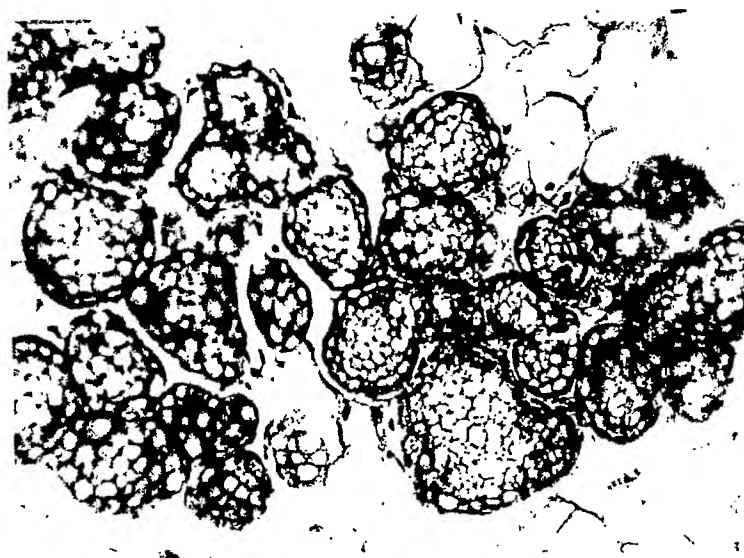
8/12

Abb. 8



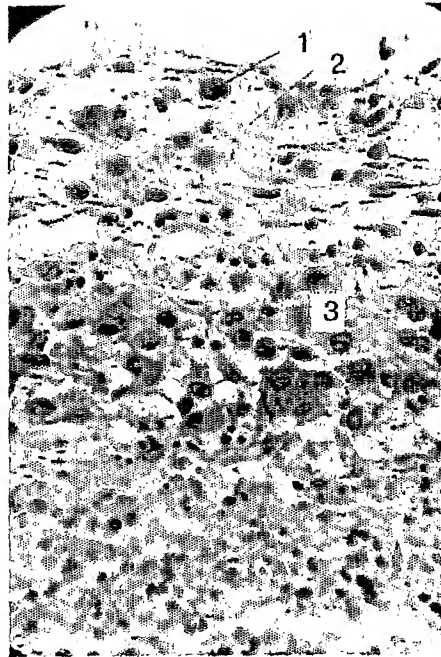
9/12

Abb. 9



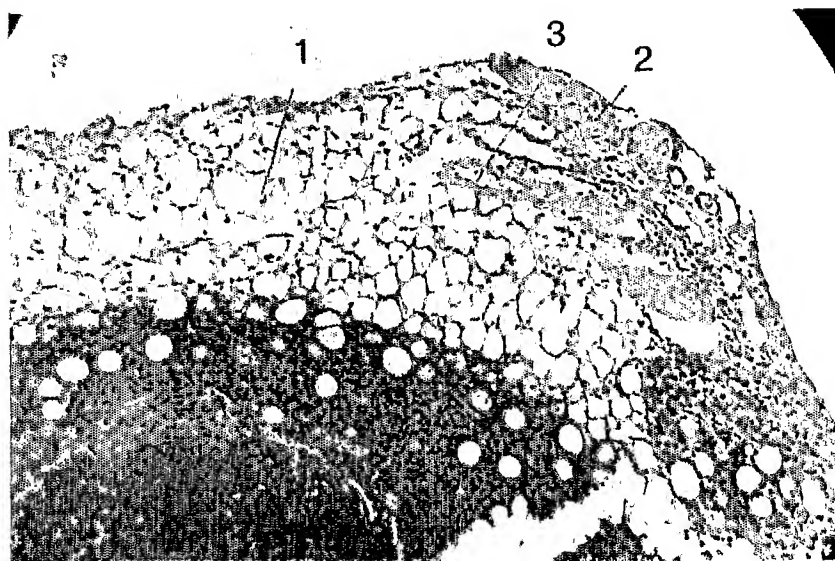
10/12

Abb. 10



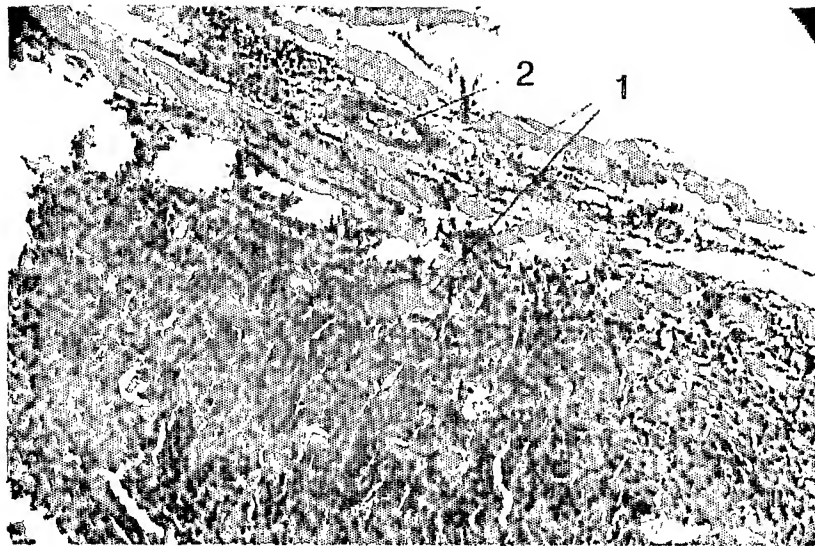
11/12

Abb. 11



12/12

Abb. 12



Internal Application No.

PCT/EP 02/07299

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
IPC 7	A61K31/28	A61K31/30	A61K31/315	A61K31/295	C07F1/08
	C07F3/06	C07F15/04	C07F15/06	C07F15/02	C07F13/00
	C07F11/00				

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 110 529 A (VAARTSTRA BRIAN A ET AL) 29 August 2000 (2000-08-29) claims	1-3,7-9
X	TEMBE G L ET AL: "Manganese(II) beta-diketonate catalysed oxidation of cyclohexane by tert-butyl hydroperoxide" REACTION KINETICS AND CATALYSIS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 63, no. 2, 1998, pages 385-389, XP001106905 ISSN: 0133-1736 table 1	1-3,7-9
X	US 5 225 561 A (BROWN DUNCAN W ET AL) 6 July 1993 (1993-07-06) tables V,VI	1-4,7-9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

*A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

*T later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

*& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 October 2002

Date of mailing of the international search report

12/11/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Elliott, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat al Application No

PCT/EP 02/07299

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NATARAJAN C ET AL: "Synthesis, spectral studies and reactivity of nickel(II), copper(II) and zinc(II) mixed ligand complexes with 2-formyl, 2-acetyl and 2-benzoyl- cyclohexanones and acetylacetone" SYNTHESIS AND REACTIVITY IN INORGANIC AND METALLOORGANIC CHEMISTRY, MARCEL DEKKER INCORPORATED, NEW YORK, US, vol. 22, no. 6, 1992, pages 827-849, XP001106127 ISSN: 0094-5714 table 1	1-3,7-9
X	BENNETT, ALISON M. A. ET AL: "The IR and proton, carbon-13 NMR spectra of the nickel(II), copper (II) and zinc(II) complexes of 2,4-pentanedione, 4-imino-2-pentanone, 4-thioxo-2-pentanone and 2,4-pentanedithione: a comparative study" POLYHEDRON, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 8, no. 18, 1989, pages 2305-2311, XP001106503 ISSN: 0277-5387 Zn(acac)2(H2O)	1-3,7-9
X	US 4 814 391 A (COLBORN ROBERT E) 21 March 1989 (1989-03-21) example 1	1-3,7-9
X	SUCH K P ET AL: "E.P.R. of Mn(2+) in acetylacetonates" MOLECULAR PHYSICS, LONDON, GB, vol. 60, no. 3, 1987, pages 553-560, XP001106702 table 1	1-3,7-9
X	KIRSTE, BURKHARD ET AL: "ENDOR study of bis(acetylacetonato) copper (II) in solid solution" JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 87, no. 5, 3 March 1983 (1983-03-03), pages 781-788, XP001105567 ISSN: 0022-3654 abstract	1-3,7-9
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interq al Application No
PCT/EP 02/07299

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; BOGUSLAVSKII, E. G. ET AL: "ESR study of copper (II) complexes with substituted thioureas" retrieved from STN Database accession no. 94:40629 XP002218071 abstract -& IZVESTIJA SIBIRSKOGO OTDELENIJA AKADEMII NAUK SSSR, SERIJA CHIMICESKICH NAUK, no. 5, 1980, pages 50-53, XP001106290 ISSN: 0002-3426</p>	1,3,7-9
X	<p>PETTY, RANDALL H. ET AL: "Cytochrome oxidase models. 2. .mu.-Bipyrimidyl mixed-metal complexes as synthetic models for the iron/ copper binuclear active site of cytochrome oxidase" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 102, no. 2, 16 January 1980 (1980-01-16), pages 611-620, XP002218070 ISSN: 0002-7863 page 613, column 1, line 12</p>	1-3,7-9
X	<p>MAROV, I. N. ET AL: "EPR study of the formation of adducts of copper (II) chelates with organic bases" RUSSIAN JOURNAL OF INORGANIC CHEMISTRY, CONSULTANTS BUREAU, US, vol. 23, no. 10, 1978, pages 1495-1501, XP001106118 ISSN: 1070-4280 figure 4</p>	1-3,7-9
X	<p>HAIDER, S. Z. ET AL: "Copper complexes of the derivatives of 2,4-pentanedione" JOURNAL OF THE BANGLADESH ACADEMY OF SCIENCES, vol. 1, no. 2, 1977, pages 53-62, XP001105570 ISSN: 0378-8121 table 1</p>	1-3,7-9

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter: 1st Application No

PCT/EP 02/07299

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KWIATKOWSKI, EDMUND: "Calculation of formation constants for 1:1 complexes from spectrophotometric data" JOURNAL OF INORGANIC AND NUCLEAR CHEMISTRY, PERGAMON PRESS LIMITED, OXFORD, GB, vol. 39, no. 9, 1977, pages 1611-1613, XP001106399 tables 1,3 ---	1-3,7-9
X	LODZINSKA, ALICJA ET AL: "X-ray and luminescence spectral investigation of chelates of zinc(II) and some other transition metals with .beta.-diketones of the R-CO-CH2-CO-R' type" ROCZNIKI CHEMII, ANNALES SOCIETATIS - CHIMICAE POLONORUM, vol. 51, no. 3, 1977, pages 425-432, XP001117460 page 431, line 9 ---	1-3,7-9
X	DD 121 525 A (WAIBLINGER) 5 August 1976 (1976-08-05) table 1 ---	1-3,7-9
A	TAMURA, HIROSHI ET AL: "DNA binding and cleaving activity of antitumor metal complex: sodium trans-dinitrobis(2,4-pentanedionato)cobalt (III)" CHEMISTRY LETTERS, CHEMICAL SOCIETY OF JAPAN, TOKYO, JP, no. 8, 1997, pages 711-712, XP001106300 the whole document ---	1-10
A	WO 90 06749 A (BYK GULDEN LOMBERG CHEMISCHE FABRIK GMBH) 28 June 1990 (1990-06-28) the whole document -----	1-4,7-10

Continuation of I.2

Claims: 1-3 (all in part)

The search initially yielded a very large number of documents detrimental to novelty. This number is so large that it becomes impossible to determine a subject matter in any of the claims for which protection might justifiably be sought (PCT Article 6). For these reasons a meaningful search covering the full range of the application appears impossible. The search was therefore limited to the subject matter of Claims 4-6 and to the use of the compounds (Claim 10).

Furthermore, the subject of Claim 2 is inconsistent with that of Claim 1 because the definition of D as diethyldithiocarbamine is not encompassed by the definition given in Claim 1 (beta-diketone). Compounds in which D is diethyldithiocarbamine were therefore not searched.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 02/07299

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6110529	A	29-08-2000	US 5820664 A	13-10-1998
			US 5536323 A	16-07-1996
			US 5204314 A	20-04-1993
			US 5453494 A	26-09-1995
			US 5280012 A	18-01-1994
			US 5225561 A	06-07-1993
			US 6214105 B1	10-04-2001
			US 6344079 B1	05-02-2002
			US 2001004470 A1	21-06-2001
			US 5919522 A	06-07-1999
			US 5916359 A	29-06-1999
			US 5840897 A	24-11-1998
			US 6126996 A	03-10-2000
			US 5487356 A	30-01-1996
			US 5711816 A	27-01-1998
			US 2001007034 A1	05-07-2001
			AT 164632 T	15-04-1998
			CA 2125657 A1	24-06-1993
			DE 69224996 D1	07-05-1998
			DE 69224996 T2	30-07-1998
			DK 616649 T3	19-10-1998
			EP 0616649 A1	28-09-1994
			ES 2115048 T3	16-06-1998
			JP 7503759 T	20-04-1995
			WO 9312266 A1	24-06-1993
			US 5362328 A	08-11-1994
			US 5337651 A	16-08-1994
			US 5431957 A	11-07-1995
			US 6218518 B1	17-04-2001
			US 5168540 A	01-12-1992
US 5225561	A	06-07-1993	US 5453494 A	26-09-1995
			US 6218518 B1	17-04-2001
			US 5820664 A	13-10-1998
			US 5840897 A	24-11-1998
			US 6110529 A	29-08-2000
			US 5168540 A	01-12-1992
			US 2001007034 A1	05-07-2001
			US 5280012 A	18-01-1994
			US 6126996 A	03-10-2000
			US 5337651 A	16-08-1994
			US 5362328 A	08-11-1994
			US 5536323 A	16-07-1996
			US 5431957 A	11-07-1995
			US 5711816 A	27-01-1998
			US 5204314 A	20-04-1993
US 4814391	A	21-03-1989	DE 3914040 A1	16-11-1989
			JP 2024318 A	26-01-1990
			US 4855467 A	08-08-1989
DD 121525	A	05-08-1976	DD 121525 A1	05-08-1976
			BG 27816 A1	15-01-1980
			DE 2634085 A1	31-03-1977
			HU 175078 B	28-05-1980
			PL 101958 B1	28-02-1979
WO 9006749	A	28-06-1990	DE 3037665 A1	06-05-1982

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/07299

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9006749 A		DE 3048109 A1	08-07-1982
		DE 3115919 A1	11-11-1982
		DE 3134711 A1	10-03-1983
		AT 15601 T	15-10-1985
		AU 540843 B2	06-12-1984
		AU 7599781 A	22-04-1982
		DE 3172350 D1	24-10-1985
		WO 9006749 A1	28-06-1990
		EP 0049486 A1	14-04-1982
		IE 51632 B1	21-01-1987
		IL 63928 A	28-02-1985
		JP 1446416 C	30-06-1988
		JP 57091916 A	08-06-1982
		JP 62054430 B	14-11-1987
		NZ 198545 A	28-02-1985
		PH 17498 A	04-09-1984
		US 4804681 A	14-02-1989
		ZA 8106839 A	29-09-1982

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/07299

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7	A61K31/28	A61K31/30	A61K31/315	A61K31/295	C07F1/08
	C07F3/06	C07F15/04	C07F15/06	C07F15/02	C07F13/00
	C07F11/00				

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K C07F

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

CHEM ABS Data, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 6 110 529 A (VAARTSTRA BRIAN A ET AL) 29. August 2000. (2000-08-29) Ansprüche ---	1-3,7-9
X	TEMBE G L ET AL: "Manganese(II) beta-diketonate catalysed oxidation of cyclohexane by tert-butyl hydroperoxide" REACTION KINETICS AND CATALYSIS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 63, Nr. 2, 1998, Seiten 385-389, XP001106905 ISSN: 0133-1736 Tabelle 1 ---	1-3,7-9
X	US 5 225 561 A (BROWN DUNCAN W ET AL) 6. Juli 1993 (1993-07-06) Tabellen V,VI ---	1-4,7-9
	--- -/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

¹ 'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

***T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist**

***X** Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* & * Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. Oktober 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

12/11/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Elliott, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>NATARAJAN C ET AL: "Synthesis, spectral studies and reactivity of nickel(II), copper(II) and zinc(II) mixed ligand complexes with 2-formyl, 2-acetyl and 2-benzoyl- cyclohexanones and acetylacetone"</p> <p>SYNTHESIS AND REACTIVITY IN INORGANIC AND METALLORGANIC CHEMISTRY, MARCEL DEKKER INCORPORATED, NEW YORK, US, Bd. 22, Nr. 6, 1992, Seiten 827-849, XP001106127 ISSN: 0094-5714 Tabelle 1</p>	1-3,7-9
X	<p>BENNETT, ALISON M. A. ET AL: "The IR and proton, carbon-13 NMR spectra of the nickel(II), copper (II) and zinc(II) complexes of 2,4-pentanedione, 4-imino-2-pentanone, 4-thioxo-2-pentanone and 2,4-pentanedithione: a comparative study"</p> <p>POLYHEDRON, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, Bd. 8, Nr. 18, 1989, Seiten 2305-2311, XP001106503 ISSN: 0277-5387 Zn(acac)2(H2O)</p>	1-3,7-9
X	<p>US 4 814 391 A (COLBORN ROBERT E) 21. März 1989 (1989-03-21) Beispiel 1</p>	1-3,7-9
X	<p>SUCH K P ET AL: "E.P.R. of Mn(2+) in acetylacetonates"</p> <p>MOLECULAR PHYSICS, LONDON, GB, Bd. 60, Nr. 3, 1987, Seiten 553-560, XP001106702 Tabelle 1</p>	1-3,7-9
X	<p>KIRSTE, BURKHARD ET AL: "ENDOR study of bis(acetylacetonato) copper (II) in solid solution"</p> <p>JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, Bd. 87, Nr. 5, 3. März 1983 (1983-03-03), Seiten 781-788, XP001105567 ISSN: 0022-3654 Zusammenfassung</p>	1-3,7-9

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; BOGUSLAVSKII, E. G. ET AL: "ESR study of copper (II) complexes with substituted thioureas" retrieved from STN Database accession no. 94:40629 XP002218071 Zusammenfassung -& IZVESTIJA SIBIRSKOGO OTDELENIJA AKADEMII NAUK SSSR, SERIJA CHIMICESKICH NAUK, Nr. 5, 1980, Seiten 50-53, XP001106290 ISSN: 0002-3426</p>	1,3,7-9
X	<p>PETTY, RANDALL H. ET AL: "Cytochrome oxidase models. 2. μ-Bipyrimidyl mixed-metal complexes as synthetic models for the iron/ copper binuclear active site of cytochrome oxidase" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, Bd. 102, Nr. 2, 16. Januar 1980 (1980-01-16), Seiten 611-620, XP002218070 ISSN: 0002-7863 Seite 613, Spalte 1, Zeile 12</p>	1-3,7-9
X	<p>MAROV, I. N. ET AL: "EPR study of the formation of adducts of copper (II) chelates with organic bases" RUSSIAN JOURNAL OF INORGANIC CHEMISTRY, CONSULTANTS BUREAU, US, Bd. 23, Nr. 10, 1978, Seiten 1495-1501, XP001106118 ISSN: 1070-4280 Abbildung 4</p>	1-3,7-9
X	<p>HAIDER, S. Z. ET AL: "Copper complexes of the derivatives of 2,4-pentanedione" JOURNAL OF THE BANGLADESH ACADEMY OF SCIENCES, Bd. 1, Nr. 2, 1977, Seiten 53-62, XP001105570 ISSN: 0378-8121 Tabelle 1</p>	1-3,7-9

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KWIATKOWSKI, EDMUND: "Calculation of formation constants for 1:1 complexes from spectrophotometric data" JOURNAL OF INORGANIC AND NUCLEAR CHEMISTRY, PERGAMON PRESS LIMITED, OXFORD, GB, Bd. 39, Nr. 9, 1977, Seiten 1611-1613, XP001106399 Tabellen 1,3 ---	1-3,7-9
X	LODZINSKA, ALICJA ET AL: "X-ray and luminescence spectral investigation of chelates of zinc(II) and some other transition metals with beta.-diketones of the R-CO-CH ₂ -CO-R' type" ROCZNIKI CHEMII, ANNALES SOCIETATIS CHIMICAE POLONORUM, Bd. 51, Nr. 3, 1977, Seiten 425-432, XP001117460 Seite 431, Zeile 9 ---	1-3,7-9
X	DD 121 525 A (WAIBLINGER) 5. August 1976 (1976-08-05) Tabelle 1 ---	1-3,7-9
A	TAMURA, HIROSHI ET AL: "DNA binding and cleaving activity of antitumor metal complex: sodium trans-dinitrobis(2,4-pentanedionato)cobalt (III)" CHEMISTRY LETTERS, CHEMICAL SOCIETY OF JAPAN, TOKYO, JP, Nr. 8, 1997, Seiten 711-712, XP001106300 das ganze Dokument ---	1-10
A	WO 90 06749 A (BYK GULDEN LOMBERG CHEMISCHE FABRIK GMBH) 28. Juni 1990 (1990-06-28) das ganze Dokument -----	1-4,7-10

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☒ Ansprüche Nr. 1-3 (alle teilweise)
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1-3 (alle teilweise)

Die Recherche ergab in ihrer Anfangsphase eine sehr große Zahl neuheitsschädlicher Dokumente. Diese Zahl ist so groß, daß sich unmöglich feststellen lässt, für was in der Gesamtheit der Patentansprüche eventuell nach zu Recht Schutz begehrt werden könnte (Art. 6 PCT). Aus diesen Gründen erscheint eine sinnvolle Recherche über den gesamten Bereich der Patentansprüche unmöglich. Die Recherche wurde daher beschränkt auf den Gegenstand der Ansprüche 4-6 sowie auf die Verwendung der Verbindungen (Anspruch 10).

Des weiteren ist der Gegenstand des Anspruchs 2 nicht im Einklang mit dem des Anspruchs 1, da die Definition für D = Diethyldithiocarbamin nicht unter den Umfang der in Anspruch 1 für D angegebenen Definition (=beta-Diketon) fällt. Verbindungen mit D = Diethyldithiocarbamin wurden daher nicht recherchiert.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT); oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern des Aktenzeichens

PCT/EP 02/07299

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6110529	A	29-08-2000	US 5820664 A 13-10-1998
			US 5536323 A 16-07-1996
			US 5204314 A 20-04-1993
			US 5453494 A 26-09-1995
			US 5280012 A 18-01-1994
			US 5225561 A 06-07-1993
			US 6214105 B1 10-04-2001
			US 6344079 B1 05-02-2002
			US 2001004470 A1 21-06-2001
			US 5919522 A 06-07-1999
			US 5916359 A 29-06-1999
			US 5840897 A 24-11-1998
			US 6126996 A 03-10-2000
			US 5487356 A 30-01-1996
			US 5711816 A 27-01-1998
			US 2001007034 A1 05-07-2001
			AT 164632 T 15-04-1998
			CA 2125657 A1 24-06-1993
			DE 69224996 D1 07-05-1998
			DE 69224996 T2 30-07-1998
			DK 616649 T3 19-10-1998
			EP 0616649 A1 28-09-1994
			ES 2115048 T3 16-06-1998
			JP 7503759 T 20-04-1995
			WO 9312266 A1 24-06-1993
			US 5362328 A 08-11-1994
			US 5337651 A 16-08-1994
			US 5431957 A 11-07-1995
			US 6218518 B1 17-04-2001
			US 5168540 A 01-12-1992
US 5225561	A	06-07-1993	US 5453494 A 26-09-1995
			US 6218518 B1 17-04-2001
			US 5820664 A 13-10-1998
			US 5840897 A 24-11-1998
			US 6110529 A 29-08-2000
			US 5168540 A 01-12-1992
			US 2001007034 A1 05-07-2001
			US 5280012 A 18-01-1994
			US 6126996 A 03-10-2000
			US 5337651 A 16-08-1994
			US 5362328 A 08-11-1994
			US 5536323 A 16-07-1996
			US 5431957 A 11-07-1995
			US 5711816 A 27-01-1998
			US 5204314 A 20-04-1993
US 4814391	A	21-03-1989	DE 3914040 A1 16-11-1989
			JP 2024318 A 26-01-1990
			US 4855467 A 08-08-1989
DD 121525	A	05-08-1976	DD 121525 A1 05-08-1976
			BG 27816 A1 15-01-1980
			DE 2634085 A1 31-03-1977
			HU 175078 B 28-05-1980
			PL 101958 B1 28-02-1979
WO 9006749	A	28-06-1990	DE 3037665 A1 06-05-1982

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/07299

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9006749 A		DE 3048109 A1	08-07-1982
		DE 3115919 A1	11-11-1982
		DE 3134711 A1	10-03-1983
		AT 15601 T	15-10-1985
		AU 540843 B2	06-12-1984
		AU 7599781 A	22-04-1982
		DE 3172350 D1	24-10-1985
		WO 9006749 A1	28-06-1990
		EP 0049486 A1	14-04-1982
		IE 51632 B1	21-01-1987
		IL 63928 A	28-02-1985
		JP 1446416 C	30-06-1988
		JP 57091916 A	08-06-1982
		JP 62054430 B	14-11-1987
		NZ 198545 A	28-02-1985
		PH 17498 A	04-09-1984
		US 4804681 A	14-02-1989
		ZA 8106839 A	29-09-1982
